

UNIVERSITE PARIS-SUD

ÉCOLE DOCTORALE CHIMIE DE PARIS-SUD  
Laboratoire de Marquage au Tritium

**CHIMIE ORGANIQUE**

**THÈSE DE DOCTORAT**

soutenue le 15/10/2012

par

**Naoko KOTERA**

**Conception et Synthèse de Nouveaux Cryptophanes pour  
des Applications en IRM du Xénon**

*Directeur de thèse :* Bernard ROUSSEAU

Directeur de recherche (CEA Saclay)

**Composition du jury :**

*Rapporteurs :* Jean-Claude CHAMBRON  
Olivia REINAUD  
*Président :* Cyrille KOUKLOVSKY  
*Examineurs :* Patrick BERTHAULT  
Alexandre MARTINEZ

Directeur de recherche (Université de Bourgogne)  
Professeur (Université Paris Descartes)  
Professeur (Université Paris Sud)  
Directeur de recherche (CEA Saclay)  
Maître de conférences (ENS Lyon)



À mes êtres chers  
M. E. K. L.



## **Remerciements**

Je voudrais remercier ici toutes ces personnes qui ont bordé le chemin tumultueux de mes années de doctorat ; celles qui m'ont poussée, choyée, aidée et nourrie.

Bernard Rousseau de m'avoir accueillie, suivie, conseillée et rassurée. Sa bienveillance, son hyperactivité et son increvable optimisme vont indéniablement me manquer pour la suite de ma carrière.

Les membres du jury : Pr. Cyrille Kouklovsky, Dr. Patrick Berthault, Dr. Jean-Claude Chambron, Dr. Alexandre Martinez et Pr. Olivia Reinaud, pour avoir accepté de juger mon travail et de m'avoir offert l'opportunité de discuter avec eux.

La crypto team dans son intégralité extensive : Ténin pour m'avoir introduite aux cryptos, Léa pour avoir été d'un très grand soutien durant ces trois années, Sébastien pour sa disponibilité et sa gentillesse, Goulven pour son aide précieuse dans la synthèse de CTV, JC pour ses blagues cryptiques et sa perspicacité, Manu pour sa bonne humeur et ses bonnes idées, Christophe pour sa contribution durant mes derniers mois de thèse.

Le service d'analyse pour avoir purifié mes nombreux produits. David, pour sa générosité, sa gentillesse et pour m'avoir fait rire pendant ces trois années, Céline pour toutes ces discussions folles au vestiaire et en coin de paillasse, Sylvie pour son éternelle pêche !

Mes collaborateurs de l'ENS Lyon : Thierry Brotin pour ces quantités de cryptophanes hydrosolubles synthétisés et Jean-Pierre Dutasta pour ses conseils avisés.

Tout le LSDRM : Patrick Berthault, Céline Boutin, Nawal Tassali, Estelle Léonce, Yves Boulard, pour leur énorme contribution dans la caractérisation des cryptophanes et l'étude de leurs applications. Ce travail de thèse ne vaudrait pas grand-chose sans toutes ces expériences en xénon hyperpolarisé.

Jean-Pierre Dognon, pour sa collaboration concernant les calculs de cavités.

Nathalie Arhel qui m'a donné envie de continuer la recherche. Son sourire, et ses encouragements m'ont permis de mener ce projet à bien.

Jubi for advising me in the synthesis of Crash, Edmond pour ses idées et ses conseils pendant ces trois années, Eric pour son attention et sa gentillesse.

Chantal, de s'être occupée de moi durant ces trois années.

Mes collègues du laboratoire de marquage au tritium. Julien, d'avoir toujours magiquement veillé sur moi, Fabien pour toutes ces merveilleuses attentions, Florence pour nos petites discussions, Stéphanie pour son extrême gentillesse, Geeketto pour ces prises de tête chimiques, Myriam de m'avoir remonté le moral plus d'une fois, Greg pour sa sérénité et ses rires, Valérie pour ses délires et sa tendresse.

Valentina, ma bonne étoile, de m'avoir emmenée dans son Italie et de m'avoir inspiré ces couleurs, Julie, ma petite fée aux chats, aux mots qui soignent et au cœur gros comme ça, Fanny, une des premières à m'avoir accueillie et recueillie et Pierre, pour ces fêtes et ces voyages... d'avoir été là, simplement.

Manon pour ses conseils et son dynamisme, et Fred pour ses conseils toujours pertinents en chimie.

Hélène et Sandrine pour les cafés chaleureux. Marie, Thierry et Yves pour leur bon accueil dans les labos de la recherche.

L'ensemble du SCBM pour leur soutien et leur aide durant ces trois années ainsi que tous ceux que j'oublie de mentionner ici, mais qui m'ont tant apporté.

Mes parents, ma sœur et mon beau-frère, sans qui je ne serais pas moi-même.

Et Léopold, sans qui je n'aurais pas envie d'être.

J'ai passé trois belles années de doctorat grâce à vous.

<b>LISTE DES ABREVIATIONS .....</b>	<b>5</b>
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>9</b>
<b>I. ÉTAT DE L'ART .....</b>	<b>13</b>
A. L'IRM $^{129}\text{Xe}$ .....	14
1. <i>IRM</i> .....	14
a) Principe physique de la résonance magnétique nucléaire .....	14
b) Principe physique de l'imagerie par résonance magnétique nucléaire .....	16
c) Des problèmes de sensibilité.....	16
2. <i>Le xénon : quels apports en IRM ?</i> .....	17
a) Un atome sensible .....	17
b) Un gaz hyperpolarisable .....	18
i- Définition de l'hyperpolarisation.....	18
ii- Méthode d'hyperpolarisation du xénon.....	19
c) Méthodes d'introduction du xénon .....	21
i- Expériences in vitro .....	21
ii- Expériences in vivo.....	22
d) Nécessité d'une biosonde .....	23
e) Cages encapsulantes .....	23
i- Critères de sélection d'une molécule hôte.....	23
ii- Les cyclodextrines .....	24
iii- Les calixarènes .....	25
iv- Les hémicarcérands.....	26
v- Les cucurbiturils.....	26
vi- Les cryptophanes .....	27
f) Améliorer la sensibilité de l'IRM $^{129}\text{Xe}$ .....	28
i- l'HYPHER-CEST .....	28
ii- Augmentation de la concentration locale en sonde .....	30
g) Visualiser plusieurs phénomènes biologiques en même temps .....	31
B. LES CRYPTOPHANES.....	32
1. <i>Les dérivés de cyclotrivratriylènes</i> .....	32
a) Synthèse de CTV.....	32
b) Symétrie et chiralité des CTV .....	34
c) Conformations des CTV .....	36
2. <i>Les cryptophanes</i> .....	37
a) Stéréochimie des cryptophanes .....	37
b) Conformations des cryptophanes .....	38
c) Synthèse de cryptophanes .....	38
i- La méthode directe.....	39
ii- La méthode template.....	41
iii- La méthode par couplage.....	43
d) Fonctionnalisation de cryptophanes .....	44
i- Synthèse et fonctionnalisation de cryptophanes-222.....	44
ii- Synthèse et fonctionnalisation de cryptophane-111 .....	51
e) Propriétés d'encapsulation des cryptophanes .....	54
i- Effet d' "induced fit" .....	55
ii- Propriétés d'encapsulation du xénon.....	56
f) Les cryptophanes-biosondes par équipes .....	60
i- Equipe de Pines et Wemmer .....	60
ii- Équipe de Dutasta et Brotin avec l'équipe de Berthault.....	65

iii- Équipe de Dmochowski .....	70
iv- Équipe de Freund .....	78
C. CONCLUSIONS ET OBJECTIFS .....	79
<b>II. DE NOUVEAUX CRYPTOPHANES POUR LE XENON .....</b>	<b>83</b>
A. CAGES DE CAVITES INTERMEDIAIRES .....	83
1. <i>Synthèse</i> .....	84
a) Une nouvelle stratégie .....	84
b) Les intermédiaires ouverts .....	85
i- Différents bras espaceurs .....	86
ii- Ratio optimal entre bras espaceur et cyclotriphénolène .....	87
c) Couplage final et caractérisation .....	88
2. <i>Propriétés d'encapsulation du xénon</i> .....	89
a) Constante d'affinité .....	90
b) Vitesse d'échange .....	90
B. DES PONTS ORIGINAUX POUR LES CRYPTOPHANES .....	91
1. <i>Cryptophanes aux ponts azotés dans la littérature</i> .....	91
2. <i>Synthèse de cryptophaniline</i> .....	92
a) Synthèse des CTV trianiline .....	92
b) Synthèse des CTV trialdéhyde .....	93
c) Couplage final .....	94
3. <i>Propriétés d'encapsulation du xénon</i> .....	95
C. CONCLUSIONS .....	96
<b>III. BIOSONDE POUR LA DETECTION DE METAUX .....</b>	<b>101</b>
A. CONCEPT DE LA BIOSONDE .....	102
B. SYNTHESE .....	103
1. <i>Stratégie de synthèse sur le cryptophane-111</i> .....	103
a) Approche rétrosynthétique .....	103
b) Synthèse de la biosonde <b>97</b> .....	104
3. <i>Stratégie de synthèse avec un cryptophane-222 hydrosoluble</i> .....	105
a) Approche rétrosynthétique .....	106
b) Synthèse du cryptophane <b>35</b> .....	106
c) Synthèse de la biosonde <b>105</b> .....	107
d) Synthèse des diastéréoisomères <b>105a</b> et <b>105b</b> .....	109
C. RESULTATS EN RMN <sup>129</sup> Xe .....	110
1. <i>Biosonde à zinc</i> .....	111
a) Test sur le mélange des deux diastéréoisomères .....	113
b) Test sur les diastéréoisomères séparés .....	114
c) Limite de détection .....	114
d) Spécificité .....	115
e) Images .....	115
2. <i>Biosonde à métaux</i> .....	116
D. CONCLUSIONS .....	116
<b>IV. BIOSONDE BIMODALE IRM <sup>129</sup>Xe ET IRM <sup>1</sup>H .....</b>	<b>119</b>
A. AGENTS DE CONTRASTE CEST ET PARACEST EN IRM <sup>1</sup> H .....	119
B. CONCEPT DE LA BIOSONDE .....	121
C. SYNTHESE DE LA BIOSONDE .....	121
1. <i>Synthèse des ligands</i> .....	121
a) Ligand long .....	122



i- Voie de synthèse 1 .....	122
ii- Voie de synthèse 2 .....	123
b) Ligand modèle .....	124
2. <i>Couplage sur le cryptophane-111</i> .....	124
a) Approche rétrosynthétique .....	124
b) Synthèse de la biosonde <b>132</b> .....	125
3. <i>Synthèse avec un cryptophane-222 hydrosoluble</i> .....	126
a) Approche rétrosynthétique .....	126
b) Synthèse de la biosonde <b>135</b> .....	127
D. CONCLUSIONS.....	128
<b>V. BIOSONDE BIMODALE IRM <sup>129</sup>XE ET FLUORESCENCE.....</b>	<b>131</b>
A. MARQUAGE DE PROTEINES PAR FLUORESCENCE .....	131
B. CONCEPT DE LA BIOSONDE.....	132
C. SYNTHESE.....	133
a) Approche rétrosynthétique .....	133
b) Synthèse du ligand .....	134
c) Couplage final .....	135
D. CARACTERISATION DU COMPLEXE BIOSONDE/TETRACYSSTEINE .....	136
1. <i>Par fluorescence</i> .....	136
a) Marquage sur une enveloppe virale .....	136
b) Marquage sur un peptide.....	137
2. <i>Par LC/MS</i> .....	139
3. <i>Par RMN <sup>129</sup>Xe</i> .....	140
E. BIOSONDES ENANTIOPURES.....	141
1. <i>Synthèse</i> .....	141
2. <i>Fluorescence</i> .....	142
3. <i>RMN <sup>129</sup>Xe</i> .....	143
F. CONCLUSIONS .....	144
<b>CONCLUSIONS.....</b>	<b>149</b>
<b>PERSPECTIVES.....</b>	<b>152</b>
<b>PARTIE EXPERIMENTALE .....</b>	<b>155</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>215</b>



## **Liste des abréviations**

BINAP : 2,2'-bis(diphénylphosphino)-1,1'-binaphthyle

Boc : *tert*-butoxycarbonyle

Bn : benzyle

CA : anhydrase carbonique

CB : cucurbituril

Cbz ou Z : carboxybenzyle

CEST : *Chemical Exchange Saturation Transfer*

CMH : complexe majeur d'histocompatibilité

Cp : cyclopentyle

Cp\* : pentaméthylcyclopentyle

CTV : cyclotrivératrilène

CTTV : cyclotétravératrilène

Da : Dalton

DCC : dicyclohexylcarbodiimide

DCM : dichlorométhane

DIEA : diisopropyléthylamine

DHP : dihydropyrane

DMF : diméthylformamide

DMSO : diméthylsulfoxyde

EDCI : *N*'-éthyl-*N*-diméthylaminopropylcarbodiimide

EDT : éthanedithiol

FID : *Free Induction Decay*

GFP : *Green Fluorescent Protein*

HEPES : acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pypérazine éthane sulfonique

HOBt : *N*-hydroxybenzotriazole

HSA : *Human Serum Albumine*

HYPER-CEST : *Hyperpolarized Chemical Exchange Saturation Transfer*

ITC : *Isothermal Titration Calorimetry*

IRM : Imagerie par Résonance Magnétique

KMOPS : 3-(*N*-morpholino)propanesulfonate de potassium

MMP : métalloprotéase matricielle

Ms : méthanesulfonyle  
NBS : *N*-bromosuccinimide  
NHS : *N*-hydroxysuccinimide  
NMDA : *N*-méthyl-D-aspartate  
NMP : *N*-méthylpyrrolidone  
NTA : acide nitrilotriacétique  
PARACEST : *Paramagnetic Chemical Exchange Saturation Transfer*  
PEG : polyéthylène glycol  
PIPES : acide pipérazine-*N,N'*-bis(2-éthanesulfonique)  
PyBOP : benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidinophosphonium hexafluorophosphate  
RGD : arginine-glycine-aspartate  
RMN : Résonance Magnétique Nucléaire  
SPINOE : *Spin Polarized-Induced Nuclear Overhauser Effect*  
TCEP : *tris*(2-carboxyéthyl)phosphine  
TDM : tomodensitométrie  
TEA : triéthylamine  
TEP : Tomographie par Émission de Positons  
TEMP : Tomographie par Émission Mono-Photonique  
Tf : trifluorométhanesulfonyle  
TFA : acide trifluoroacétique  
THF : tétrahydrofurane  
THP : tétrahydropyranyle  
Tris : *tris*(hydroxyméthyl)aminométhane  
Ts : toluènesulfonyle

# **INTRODUCTION**



## Introduction

L'imagerie médicale, qui a pris un essor considérable ce dernier siècle, se tourne petit à petit vers l'imagerie moléculaire. La détection plus fiable de nombreuses cibles permettrait une meilleure compréhension et un diagnostic plus précoce de pathologies.

L'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM) est une technique prometteuse largement répandue dans les milieux hospitaliers. Elle est non invasive, présente une bonne résolution spatiale et permet de visualiser en profondeur dans un organisme vivant. Elle possède cependant quelques défauts, dont sa faible sensibilité. Pour palier ce problème, les chercheurs ont proposé plusieurs solutions telles que l'utilisation des agents de contraste. Ainsi, des complexes de gadolinium ou des nanoparticules d'oxyde de fer améliorent la qualité des images en IRM  $^1\text{H}$ . Cependant, l'observation des protons atteint rapidement ses limites. L'utilisation d'autres espèces hyperpolarisables peut permettre l'accès à de meilleures sensibilités.

Au cours de cette thèse, nous nous sommes intéressés à l'IRM  $^{129}\text{Xe}$ . Le xénon est un gaz inerte avec un nuage électronique polarisable qui le rend extrêmement sensible à son environnement chimique. Cela se traduit par une large gamme de déplacements chimiques. De plus, le xénon est hyperpolarisable, ce qui permet d'augmenter drastiquement le rapport signal sur bruit et de résoudre les problèmes de sensibilité de l'IRM. Cependant, n'étant spécifique d'aucun récepteur biologique, le xénon nécessite d'être vectorisé. Pour ce faire, des auteurs ont proposé son encapsulation dans une cage moléculaire capable de reconnaître la cible biologique à imager. Les meilleurs candidats pour une encapsulation optimale du xénon sont aujourd'hui les cryptophanes, synthétisés pour la première fois dans le laboratoire de Collet en 1981<sup>1</sup>.

Les cryptophanes sont des molécules cages constituées de deux unités cyclotrivératrilènes reliées entre elles par des chaînes pontantes. En 2001, l'équipe de Pines à Berkeley, met au point la première biosonde RMN  $^{129}\text{Xe}$  en détectant le complexe biotine-avidine grâce à un cryptophane décoré par une molécule de biotine<sup>2</sup>. Depuis, de nombreux chercheurs travaillent sur cette thématique dont l'équipe de Dutasta et Brotin à Lyon, de Pines et Wemmer à

---

<sup>1</sup> J. Gabard, A. Collet, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1981**, 1137

<sup>2</sup> M. M. Spence, S. M. Rubin, I. E. Dimitrov, E. J. Ruiz, D. E. Wemmer, A. Pines, S. Q. Yaoi, F. Tiani, P. G. Schultz, *PNAS*, **2001**, 98, 10654

Berkeley, de Dmochowski à Philadelphie, de Freund à Berlin, de Holmann à Georgetown, de Schröder à Berlin, de Chambron à Dijon et de Berthault et Rousseau à Saclay.

Nous nous sommes fixés comme objectif dans cette thèse de concevoir et de synthétiser de nouvelles cages plus adaptées pour les applications en IRM  $^{129}\text{Xe}$  ainsi que des biosondes pertinentes pour se rapprocher d'applications *in vivo*.

Dans une première partie de ma thèse, nous nous sommes intéressés au développement de nouvelles cages afin d'étudier et d'affiner les propriétés d'encapsulation du xénon au sein des cryptophanes. Nous avons voulu faire varier finement la taille de la cavité interne des cryptophanes en jouant sur la longueur des chaînes reliant les deux cyclotrivrétrilènes. Nous avons également introduit d'autres hétéroatomes sur les ponts afin de changer l'environnement chimique du xénon au sein de la cage.

Dans les parties suivantes, nous nous sommes concentrés sur la conception de biosondes par fonctionnalisation de cryptophanes déjà décrits pour diverses applications d'intérêt biologique. D'une part, nous avons évalué la possibilité de détecter des métaux de manière plus spécifique et plus sensible grâce à l'IRM xénon hyperpolarisé. D'autre part, nous avons travaillé sur la conception de biosondes bimodales, afin de coupler des techniques complémentaires d'imagerie médicale.

Ces travaux de thèse ont été réalisés en collaboration avec plusieurs partenaires : Dr. Patrick Berthault et son équipe au CEA Saclay pour les nombreuses expériences de caractérisations par RMN  $^{129}\text{Xe}$  hyperpolarisé des cages synthétisées, Dr. Thierry Broton et Dr. Jean-Pierre Dutasta à l'ENS de Lyon pour la synthèse de cryptophanes, Dr. Nathalie Arhel à l'Institut Pasteur pour les expériences de marquage de protéines "taguées" cystéine suivies par fluorescence ainsi que Dr. Éric Doris et son équipe pour la synthèse de la sonde CrAsH.



## **I. ÉTAT DE L'ART**



# I. État de l'art

Le développement de techniques d'imagerie médicale est la clef de diagnostics plus précoces de maladies et de meilleurs suivis de traitements. Aujourd'hui, la diversité des modalités disponibles pose la question légitime du choix de l'une d'entre elles. Les différentes méthodes peuvent se révéler complémentaires<sup>3,4</sup> selon la nature et les symptômes de la pathologie à visualiser.

En effet, si l'imagerie optique a une sensibilité inégalée, elle ne permet pas d'aller en profondeur dans les tissus. Les tomographies par émission de positons ou par émission monophotoniques (TEP et TEMP) permettent de sonder tout l'intérieur du corps humain, mais n'ont pas de bonnes résolutions spatiales et temporelles. La tomodensitométrie (TDM) ou scanner a une application limitée souvent aux os et aux tumeurs solides. L'utilisation de ces deux dernières méthodes doit être modérée à cause des doses d'irradiations ionisantes non négligeables délivrées pendant l'examen. Les ultrasons sont une technique peu coûteuse mais dont la sensibilité reste assez faible. Les caractéristiques les plus pertinentes de ces méthodes d'imagerie courantes sont comparées dans le tableau suivant (Tableau 1).

	TEP/TEMP	TDM	Imagerie optique	IRM	Ultrasons
Spectre de radiation	Rayons $\gamma$	Rayons X	Visible à l'IR	Ondes radio	Ondes haute fréquence
Résolution spatiale	1-10 mm	100 $\mu\text{m}$	25-50 $\mu\text{m}$	10-100 $\mu\text{m}$	30 $\mu\text{m}$
Résolution temporelle	60-1000 s	10-100 ms	1-200 ms	10-100 ms	1-100 ms
Sensibilité	pM	$\mu\text{M}$	fM-nM	$\mu\text{M}$ -mM	$\mu\text{M}$ -mM
Coût	+++	++	+	+++	+
Autres remarques	Radiations ionisantes	Contraste limité pour les tissus mous  Radiations ionisantes	Imagerie limitée en profondeur		Imagerie limitée en profondeur ou derrière des masses hétérogènes (os/poumons)

Tableau 1 : Comparaison des techniques classiques d'imagerie médicale

<sup>3</sup> S. Pirot, *Neuropsychiatrie : Tendances et Débats* **2008**, 33, 37

<sup>4</sup> Journal du CNRS n°260-261, septembre-octobre **2011**

Malgré son coût et sa faible sensibilité, l'imagerie par résonance magnétique (IRM) reste un bon compromis pour faire de l'imagerie fonctionnelle *in vivo* en temps réel. Dans la suite de cette thèse, c'est à cette méthode que nous nous intéresserons plus particulièrement.

## A. L'IRM $^{129}\text{Xe}$

### 1. IRM

L'IRM est une technique d'imagerie médicale non invasive largement répandue dans les milieux hospitaliers. Elle donne accès à des images en deux ou trois dimensions de l'intérieur du corps avec de bonnes résolutions spatiale et temporelle. Ces images concernent les tissus mous, essentiellement le système nerveux, les poumons, les muscles ou le cœur. L'IRM permet de donner des informations sur l'anatomie mais aussi sur la fonction de ces organes. Elle repose sur le principe de résonance magnétique nucléaire (RMN) et souffre de la faible sensibilité intrinsèque de ce phénomène.

#### a) Principe physique de la résonance magnétique nucléaire

En 1946, Bloch et Purcell (prix Nobel 1952) sont les premiers à faire les mesures du magnétisme nucléaire par induction magnétique. Ils jettent alors les bases des méthodes actuelles de détection RMN. Par la suite, c'est dans ce même domaine que des prix Nobel seront également décernés en chimie (Ernst en 1991, Wüthrich en 2002) et en médecine (Lauterbur<sup>5</sup> et Mansfield en 2003).

En l'absence de champ magnétique, les moments magnétiques des spins des protons n'ont pas d'orientation particulière. Sous l'action d'un champ magnétique  $\vec{B}_0$ , ils vont se mettre à tourner autour de la direction du champ à une vitesse angulaire de  $\omega_0 = \gamma B_0$ ,  $\gamma$  étant le rapport gyromagnétique, décrivant ainsi un cône dit cône de précession. On crée alors une composante longitudinale de l'aimantation  $\vec{M}_0$  sur l'axe z,  $\vec{M}_0$  étant la somme des moments magnétiques de spin de chaque proton (Figure 1a). Les déphasages qui existent entre les différents moments magnétiques de spin font qu'il n'y a pas de composante transversale dans le plan (x,y).

---

<sup>5</sup> P.C. Lauterbur, *Nature New. Biol.*, **1973**, 242, 190

Lorsque l'on applique un courant sinusoïdal dans une bobine d'axe perpendiculaire à  $\vec{B}_0$  à la fréquence de résonance des protons, ceci crée un champ magnétique  $\vec{B}_1$  qui perturbe les moments magnétiques de spin. Ces derniers qui tournaient autour de  $\vec{B}_0$  d'une manière déphasée entrent alors en cohérence de phase et basculent autour de  $\vec{B}_1$  provoquant l'apparition d'une aimantation transversale  $\vec{M}_{xy}$  dans le plan (x,y) (Figure 1b).

Lorsque l'on supprime le champ  $\vec{B}_1$ , la rupture de la cohérence de phase causée par les interactions entre les aimantations nucléaires des noyaux voisins, entraîne la disparition de l'aimantation transversale. L'aimantation revient alors dans sa position d'équilibre sous l'action de  $\vec{B}_0$ . Ce retour à l'équilibre s'effectue suivant un mouvement de précession libre durant lequel les composantes longitudinale  $\vec{M}_z$  et transversale  $\vec{M}_{xy}$  de l'aimantation  $\vec{M}$  varient au cours du temps (Figure 1c).

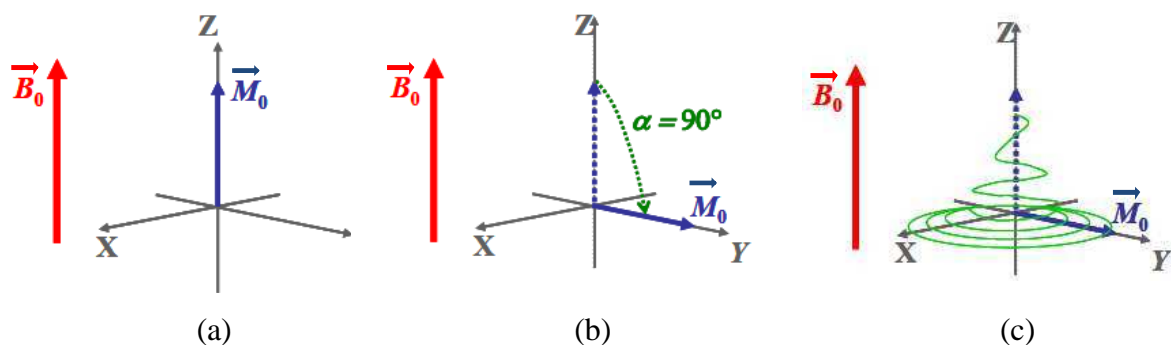


Figure 1 : (a) aimantation  $\vec{M}_0$  à l'équilibre ; (b) basculement de l'aimantation  $\vec{M}_0$  d'un angle  $\alpha = 90^\circ$  dans le plan transversal après une excitation RF ; (c) retour de l'aimantation  $\vec{M}_0$  vers la position d'équilibre en un mouvement complexe

Ce phénomène, appelé relaxation, est caractérisé par deux paramètres:

(1) Le temps de relaxation longitudinal  $T_1$

Il correspond au temps que mettent les moments magnétiques à retrouver leur alignement suivant l'axe z.

(2) Le temps de relaxation transversal  $T_2$

Il décrit la décroissance du signal dans le plan (x,y).

Le signal de précession libre (FID ou *Free Induction Decay*) est enregistré. À la suite d'une transformée de Fourier, un signal fonction de la fréquence de résonance représentant le spectre RMN final est ainsi obtenu.

## b) Principe physique de l'imagerie par résonance magnétique nucléaire

Pour obtenir une image par résonance magnétique, le principe consiste à appliquer un gradient de champ magnétique dans l'espace de sorte que la fréquence de résonance change d'un point à l'autre de l'objet pour un même noyau. Avec une onde de fréquence fixe, seule une région entrera en résonance et fournira un signal. En décalant la fréquence sondée, une région différente se trouvera en situation de résonance (Figure 2). Le signal magnétique émis par les noyaux juste après la résonance est détecté et un traitement informatique permet de reconstruire une image tridimensionnelle présentée en coupes successives.

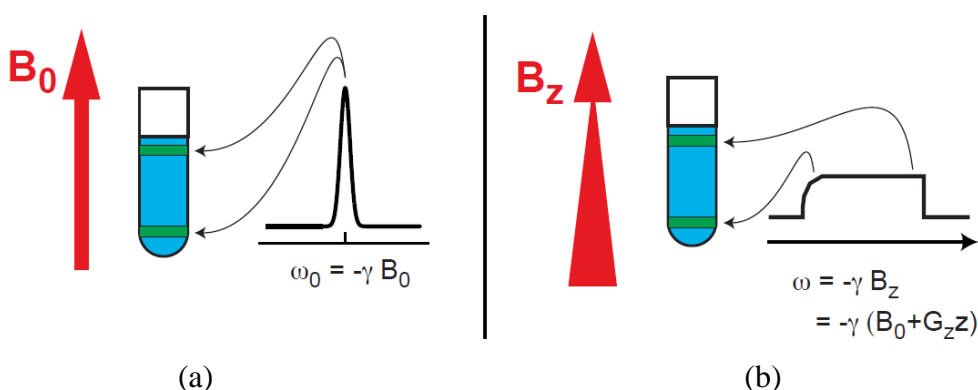


Figure 2<sup>6</sup> : principe de l'imagerie par résonance magnétique (a) spectroscopie RMN (b) imagerie par résonance magnétique 1D

## c) Des problèmes de sensibilité

La faible sensibilité de l'IRM provient de la faible sensibilité intrinsèque du phénomène de RMN. L'intensité du signal est en effet proportionnelle à la polarisation qui dépend de la différence des populations de spins entre les deux états d'énergie (Équation 1).

$$P = \frac{|N_+ - N_-|}{N_+ + N_-} = \tanh\left(\frac{\gamma \cdot \hbar \cdot B_0}{2 \cdot k_B \cdot T}\right)$$

Équation 1

Pour une particule de spin  $I = 1/2$ ,  $N_+$  et  $N_-$  représentent le nombre de spins sur les deux états de spin:  $m_I = 1/2$  et  $m_I = -1/2$ ,  $B_0$  le champ magnétique appliqué,  $\gamma$  le rapport gyromagnétique,  $k_B$  la constante de Boltzmann et  $T$  la température absolue.

<sup>6</sup> L. Emsley, Cours M1 RMN Structurale

A l'équilibre thermodynamique, la différence entre les deux populations de spins et donc de la polarisation nucléaire est très faible. Le ratio signal sur bruit en RMN étant proportionnel à  $P$ , les applications de l'IRM sont essentiellement restreintes à  $^1\text{H}$  (d'abondance naturelle de 99,984% et de  $\gamma$  élevé). Les autres noyaux ne sont quasiment pas utilisés à cause de leur faible abondance naturelle et/ou de leur faible concentration et sensibilité comparés au proton. Si nous parlons ici d'IRM  $^{129}\text{Xe}$ , c'est que le xénon est un atome aux propriétés particulières.

## 2. Le xénon : quels apports en IRM ?

Le xénon est un gaz noble, découvert par Ramsey et Travers en 1898 par analyse spectrale des résidus de l'air. Il est chimiquement inerte, inodore, incolore et quatre fois plus dense que l'air.

Dans le corps humain, il inhibe les récepteurs glutamatergiques N-méthyl-D-aspartate ou NMDA, ce qui lui confère des propriétés anesthésiantes. À des concentrations plus faibles, il joue un rôle d'agent neuroprotecteur par interaction avec les protéines globulaires cytosoliques<sup>7</sup>.

En imagerie médicale, l'isotope  $^{133}\text{Xe}$  a déjà fait ses preuves en scintigraphie des poumons<sup>8</sup>. Deux isotopes sont observables en RMN ; le xénon 129 d'abondance naturelle de 26,4 % et de spin 1/2 et le xénon 131 d'abondance naturelle de 21,2 % et de spin 3/2. Le meilleur candidat pour les applications en RMN est l'isotope 129 qui possède un signal RMN plus simple et un temps de relaxation plus long. Le gaz hyperpolarisé a été initialement utilisé pour l'imagerie des poumons<sup>9,10</sup> puis du cerveau.

### a) Un atome sensible

---

<sup>7</sup> N. Colloc'h, J. Sopkova-de Oliveira Santos, P. Retailleau, D. Vivarès, F. Bonneté, B. Langlois d'Estainto, B. Gallois, A. Brisson, J. J. Risso, M. Lemaire, T. Prangé, J.H. Abraini, *Biophys. J.*, **2007**, 92, 217

<sup>8</sup> K. Kawakami, *Ann. Nucl. Med.*, **1997**, 11, 67

<sup>9</sup> M. S. Albert, G. D. Cates, B. Driehuys, W. Happer, B. Saam, C. S. Springer, Jr, A. Wishnia, *Nature*, **1994**, 370, 199

<sup>10</sup> J. P. Mugler III, B. Driehuys, J. R. Brookeman, G. D. Cates, S. S. Berr, R. G. Bryant, T. M. Daniel, E. E. del Lange, J. H. Downs III, C. J. Erickson, W. Happer, D. P. Hinton, N. F. Kassel, T. Maier, C. D. Phillips, B. T. Saam, K. L. Sauer, M. E. Wagshul, *Magn. Reson. Med.*, **1997**, 37, 809

Le xénon possède un large nuage électronique hautement polarisable, ce qui le rend extrêmement sensible à son environnement chimique. Cela se traduit en terme de RMN par une large gamme de déplacements chimiques<sup>11,12,13</sup>(Figure 3).

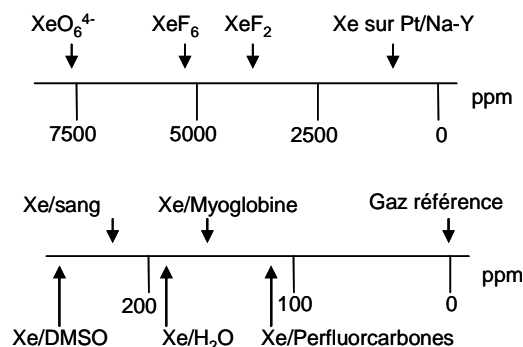


Figure 3 : déplacement chimique du xénon dans différents environnements

### b) Un gaz hyperpolarisable

#### *i- Définition de l'hyperpolarisation*

A l'équilibre thermodynamique, les populations de spin dans les deux états d'énergie sont peu différentes. L'état d'hyperpolarisation se définit par une différence accrue des populations des deux états de spins (Figure 4).

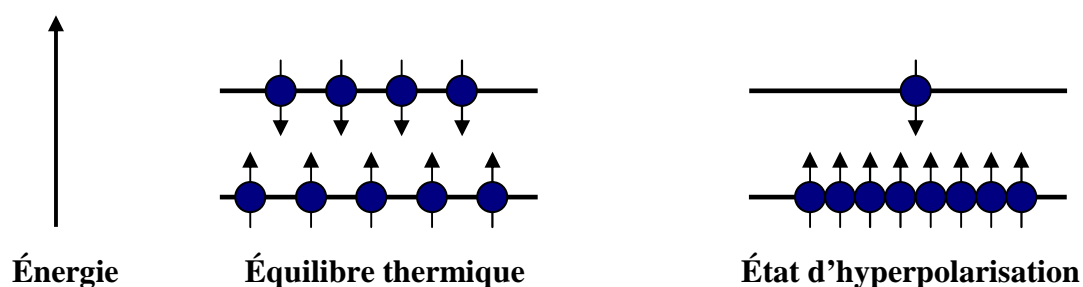


Figure 4 : distribution des populations de spin à l'état d'équilibre et état hyperpolarisé

<sup>11</sup> B. M. Goodson, Journal of Magnetic Resonance, **2002**, 155, 157

<sup>12</sup> T. Pietrass, H. C. Gaede, *Adv. Mat.*, **1995**, 7, 826

<sup>13</sup> C. Boutin, H. Desvaux, M. Carrière, F. Leteurre, N. Jamin, Y. Boulard, P. Berthault, *NMR Biomed.*, **2011**, 24, 1264



L'intensité du signal RMN étant directement lié à la polarisation P, l'hyperpolarisation est un moyen efficace d'accroître la sensibilité de l'IRM.

## *ii- Méthode d'hyperpolarisation du xénon*

Les gaz nobles peuvent être hyperpolarisés par pompage optique<sup>14,15,16</sup>. La méthode consiste à mélanger le gaz d'intérêt avec les vapeurs d'un métal alcalin ou d'atomes métastables (en général il s'agira du  $^3\text{He}$ ), et d'irradier successivement le mélange avec une lumière circulaire polarisée de laser à des fréquences appropriées. Le moment angulaire de la lumière polarisée est absorbé par le métal alcalin ou les atomes métastables puis leur polarisation est à leur tour transférée au gaz noble par collisions interatomiques.

Dans le cas du xénon, le métal alcalin utilisé est le rubidium. Nous pouvons détailler le processus dans ses deux étapes.

La première étape est le pompage optique de l'espèce alcaline<sup>16,17</sup>.

Un mélange de vapeur de rubidium, d'azote et de xénon est introduit dans une cellule préalablement chauffée à 100 °C, puis on irradie par un laser à 794 nm. Dans ces conditions et en présence d'un champ magnétique, il n'existe qu'une seule transition électronique permise (Figure 5). Elle correspond à la transition entre les niveaux de spin électronique  $-1/2$  et le premier état excité de spin  $+1/2$  du rubidium. Des collisions successives entre atomes permettent d'égaliser les populations entre états excités qui ensuite se dés excitent pour retourner à l'état fondamental. La vitesse d'excitation du spin électronique étant supérieure à la vitesse de relaxation électronique, on obtient une forte concentration de rubidium à l'état de spin électronique  $+1/2$ .

---

<sup>14</sup> A. J. Kastler, *Phys. Radium*, **1950**, 11, 225

<sup>15</sup> M. A. Bouchiat, T. R. Carver, C. M. Varnum, *Phys. Rev. Lett.*, **1960**, 5, 373

<sup>16</sup> B. M. Goodson, *Journal of Magnetic Resonance*, **2002**, 155, 157

<sup>17</sup> P. Berthault, G. Hubert, H. Desvaux, *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, **2009**, 55, 35

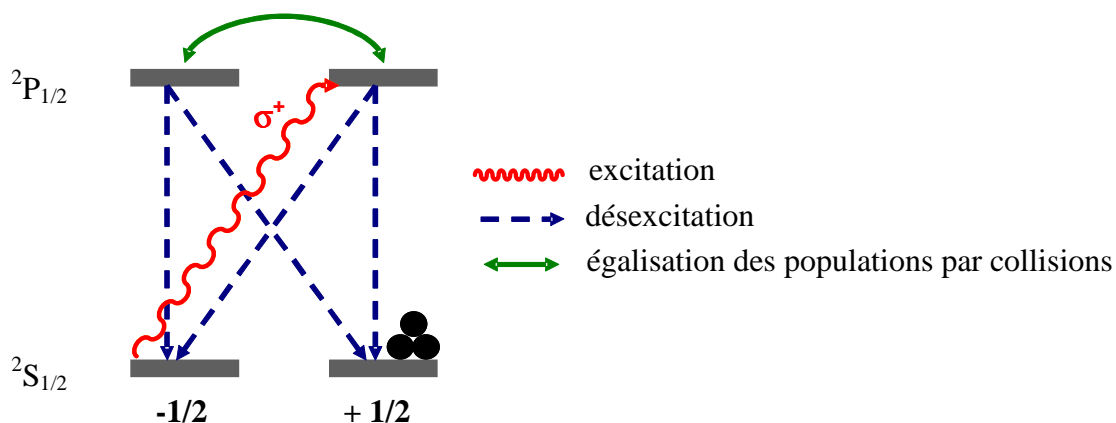


Figure 5 : polarisation électronique du rubidium

La seconde étape fait intervenir des collisions multiples entre le rubidium et le xénon en phase gazeuse qui donnent lieu à un couplage dipolaire entre le spin électronique du métal et le spin nucléaire du gaz (Figure 6). On arrive alors à obtenir en un temps très court, une importante concentration de xénon fortement polarisé, la relaxation nucléaire de ce dernier étant vraiment minime.

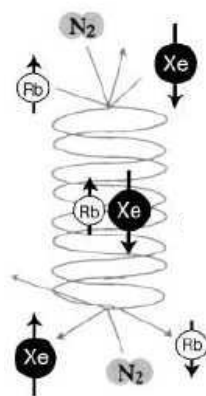


Figure 6 : transfert de polarisation entre le rubidium et le xénon

Le xénon hyperpolarisé est ensuite recueilli par condensation et peut être transvasé dans les expériences de RMN. Cette hyperpolarisation entraîne une augmentation de la sensibilité du signal RMN d'un facteur  $10^4$  à  $10^5$  (Figure 7).

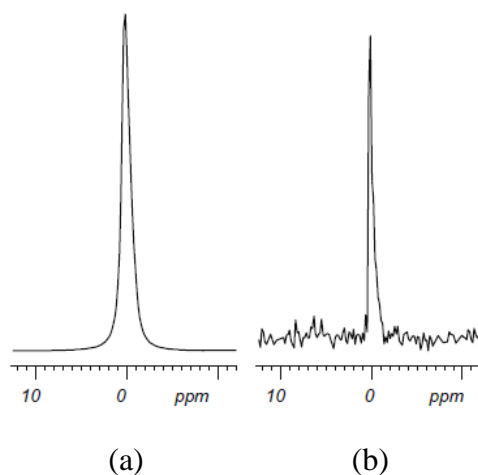


Figure 7 : pour un même échantillon spectres RMN  $^{129}\text{Xe}$  (a) hyperpolarisé (1 scan) (b) non hyperpolarisé (15 h acquisition) (11,7 T, 293 K)<sup>17</sup>.

### c) Méthodes d'introduction du xénon

Malgré une forte polarisation du xénon après les techniques de pompage optique, les pertes de la polarisation peuvent être lourdes selon le moyen choisi pour introduire le xénon dans le système étudié. Les méthodes diffèrent selon qu'on travaille *in vitro* ou *in vivo*<sup>17</sup>.

#### *i- Expériences in vitro*

Le but est de maintenir une résolution spectrale suffisante dans les conditions expérimentales. Pour cela, les solutions qui sont peu sensibles aux conditions de gel peuvent être dégazées par des cycles de gel-dégel pour éviter les traces d'oxygène paramagnétiques et d'autres gaz dissous. La qualité des spectres peut être largement améliorée par ce simple dégazage.

Le xénon peut être délivré directement par simple expansion du gaz, ou par condensation à l'intérieur du tube utilisé pour l'expérience. Dans ce dernier cas, un point froid peut être créé au dessus de la solution grâce à un spinner creux qui s'adapte au tube RMN et que l'on peut remplir d'azote liquide. L'opération s'effectue en marge du spectromètre afin de garder la polarisation du xénon. Enfin, le tube est secoué afin d'accélérer la dissolution du xénon.

Pour des solutions biologiques qui ne résistent pas aux conditions de gel et dégel ou qui ne peuvent être secoués vigoureusement, une méthode alternative consiste à dégazer en bullant de l'hélium ou de l'argon avant d'ajouter le xénon (qui peut être lui-même bullé).

Le groupe de Pines a d'ailleurs développé un système de flux constant de xénon qui permet d'avoir une polarisation quasi-constante du xénon<sup>18</sup>. Ce flux doit cependant être éteint pendant la durée de l'expérience pour ne pas perdre la résolution spectrale.

Une dernière solution présentée par Baumer<sup>19</sup> consiste à utiliser des membranes à fibres creuses commercialement disponibles qui permettent d'éviter la formation de bulles et qui ne nécessite pas l'arrêt du flux de xénon.

## *ii- Expériences in vivo*

Pour les expériences in vivo, le xénon peut être introduit de deux manières différentes; soit par inhalation, soit par injection. Les deux méthodes ont chacune leurs avantages et leurs inconvénients.

### L'inhalation

C'est la manière la plus simple d'apporter le xénon dans le corps. Que ce soit par intubation d'un animal anesthésié ou par inhalation volontaire dans le cas d'un homme, il est possible d'observer les poumons grâce au xénon hyperpolarisé<sup>9</sup>. Il est même viable dans certains cas<sup>20</sup> d'observer le cerveau par simple inhalation puisque le gaz noble ne met pas plus de 1 à 2 secondes pour passer la barrière hémato-encéphalique.

### L'injection

C'est une méthode certes plus invasive mais aussi plus directe que l'inhalation. Le xénon doit alors être dissous dans un solvant biocompatible, dans lequel il est hautement soluble, et où la vitesse de relaxation du gaz est limitée. Jusqu'ici, le xénon a été injecté dans des solutions salines (faible solubilité mais  $T_1$  long), des émulsions intralipides c'est-à-dire des suspensions aqueuses de vésicules lipidiques<sup>21,22</sup> (meilleure solubilité et  $T_1$  acceptable), des émulsions de perfluorocarbones<sup>23,24,25</sup> (bonne solubilité et long  $T_1$ ) ou encore des liposomes<sup>26</sup>.

---

<sup>18</sup> S.I. Han, S. Garcia, T.J. Lowery, E.J. Ruiz, J.A. Seeley, L. Chavez, D.S. King, D.E. Wemmer, A. Pines, *Anal. Chem.* **2005**, 77, 4008

<sup>19</sup> D. Baumer, E. Brunner, P. Blümli, P.P. Zänker, H.W. Spiess, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, 45, 7282

<sup>20</sup> S.D. Swanson, M.S. Rosen, B.W. Agranoff, K.P. Coulter, R.C. Welsh, T.E. Chupp, *Magn. Reson. Med.* **1997**, 38, 695.

<sup>21</sup> G. Duhamel, P. Choquet, E. Grillon, L. Lamalle, J.-L. Leviel, A. Ziegler, A. Constantinesco, *Magn. Reson. Med.*, **2001**, 46, 208

#### d) Nécessité d'une biosonde

Une fois administré, le xénon n'ayant aucune spécificité particulière (mis à part les récepteurs NMDA), il ne permettra pas de visualiser des cibles d'intérêt biologique. Pour rendre l'IRM xénon fonctionnelle, il est nécessaire d'introduire une biosonde.

Une biosonde<sup>2</sup> est une molécule composée d'une entité hôte qui va permettre d'encapsuler le gaz et de lui conférer un environnement chimique particulier, d'un bras espaceur et d'une antenne de reconnaissance de la cible d'intérêt (Figure 8).

Le xénon étant extrêmement sensible à son environnement chimique, les déplacements chimiques en RMN  $^{129}\text{Xe}$  vont être différents selon que le xénon soit libre, ou bien encapsulé dans la biosonde seule ou encore encapsulé dans la biosonde fixée à sa cible biologique.

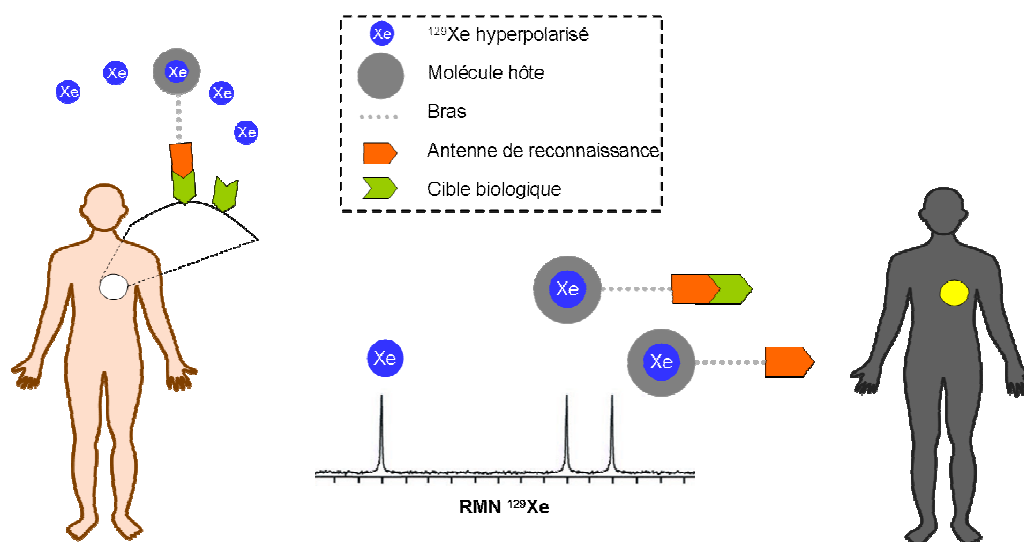


Figure 8 : concept d'une biosonde IRM  $^{129}\text{Xe}$  hyperpolarisé

#### e) Cages encapsulantes

##### *i- Critères de sélection d'une molécule hôte*

<sup>22</sup> B.M. Goodson, Y.Q. Song, R.E. Taylor, V.D. Schepkin, K.M. Brennan, G.C. Chingas, T.F. Budinger, G. Navon, A. Pines, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1997**, 94, 14725

<sup>23</sup> J.G. Riess, *Chem. Rev.*, **2001**, 101, 2797

<sup>24</sup> A.K. Venkatesh, L. Zhao, D. Balamore, F.A. Jolesz, M.S. Albert, *NMR Biomed.*, **2000**, 13, 245

<sup>25</sup> J. Wolber, I.J. Rowland, M.O. Leach, A. Bifone, *Magn. Reson. Med.* **1999**, 41, 442

<sup>26</sup> G. Duhamel, P. Choquet, E. Grillon, J.-L. Leviel, A. Ziegler, A. Constantinesco, *C.R. Acad. Sci. Paris*, **2001**, 4, 789

Les critères requis pour une molécule hôte efficace du xénon sont les suivants :

- (1) Posséder la meilleure affinité possible pour le xénon
- (2) Permettre un échange entrée/sortie du xénon adapté. Il doit être lent à l'échelle de la RMN mais suffisamment rapide pour remplir constamment la cage avec du xénon hyperpolarisé frais
- (3) Conférer au xénon encapsulé un signal RMN dont le déplacement chimique est notablement éloigné de celui du xénon libre
- (4) Minimiser la relaxation au sein de la cage
- (5) Être soluble en milieu aqueux et être facilement adressable pour permettre des applications *in vivo*

Pour concevoir une molécule de meilleure affinité, on peut se référer aux travaux de Rebek qui ont montré en 1998 qu'il existe un ratio optimal entre la taille de la molécule invitée et la taille de la molécule hôte de  $0,55 \pm 0,09$ <sup>27</sup>. Le volume de van der Waals du xénon étant de 42 Å<sup>3</sup>, le volume de la molécule hôte idéale serait de 76 Å<sup>3</sup>.

De plus, la nature des interactions entre l'hôte et le gaz noble est importante<sup>28</sup>. D'une part, la stabilisation du complexe xénon-hôte peut venir des forces dispersives de London (multipôles induits) qui dépendent des polarisabilités réciproques des deux molécules non polaires<sup>29</sup>. Ces énergies sont connues pour stabiliser les atomes des gaz nobles mais interviennent aussi dans des systèmes aromatiques où les électrons sont délocalisés. D'autre part, la formation du complexe peut être entropiquement favorisée dans l'eau par effet hydrophobe du xénon.

On trouve dans la littérature un certain nombre de cages encapsulant le xénon<sup>30</sup>, en voici quelques exemples.

## *ii- Les cyclodextrines*

Les cyclodextrines sont des oligosaccharides cycliques, constitués de 6 à 12 motifs glucose reliés par des liaisons  $\alpha$ -1,4.

---

<sup>27</sup> S. Mecozzi, J. Rebek Jr., *Chem. Eur. J.*, **1998**, 4, 1016

<sup>28</sup> J. Černý, P. Hobza, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2007**, 9, 5291

<sup>29</sup> F. London, *Z. Phys.*, **1930**, 60, 491.

<sup>30</sup> D.M. Rudkevich, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2004**, 43, 558

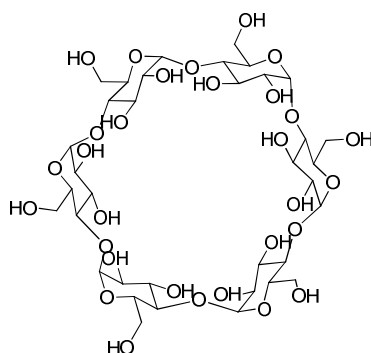


Figure 9 : structure d'  $\alpha$ -cyclodextrine

L' $\alpha$ -cyclodextrine (Figure 9), la plus petite cyclodextrine composée de 6 unités glucose, possède un volume interne compris entre 140 et 170 Å<sup>3</sup>. La cage encapsule bien le xénon mais le trop grand volume de sa cavité entraîne un échange trop rapide du xénon dans et hors de la cage. De plus, sa constante d'affinité pour le xénon a été estimée à 20 M<sup>-1</sup> à 298 K, ce qui est trop faible pour considérer des applications potentielles en tant que biosonde<sup>31</sup>.

### iii- Les calixarènes

Les calixarènes sont composés de  $n$  unités phénoliques ( $n = 4 - 20$ ) reliées entre elles par des ponts méthyléniques au niveau des positions *ortho* de la fonction hydroxyle (Figure 10). Ils sont obtenus par condensation du phénol avec le formaldéhyde en milieu basique. Ils présentent une cavité hydrophobe entre les noyaux benzéniques et une région hydrophile au niveau des groupements hydroxyle (Figure 10a). Comme les cyclodextrines, la vitesse d'entrée et de sortie du xénon dans la cage est beaucoup trop rapide et les constantes d'affinité pour le xénon sont trop faibles. À titre d'exemple, le calix[4]arène hydrosoluble STCAS (4-sulfothiacalix[4]arene sodium salt) présente une constante d'affinité d'environ 14 M<sup>-1</sup> à 298 K dans l'eau (Figure 10b)<sup>32</sup>.

<sup>31</sup> K. Bartik, M. Luhmer, S.J. Heyes, R. Ottinger, J. Reisse, *J. Magn. Reson. B*, **1995**, 109, 164

<sup>32</sup> J. Fukotomi, Y. Adachi, A. Kaneko, A. Kimura, H. Fujiwara, *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.*, **2007**, 58, 115

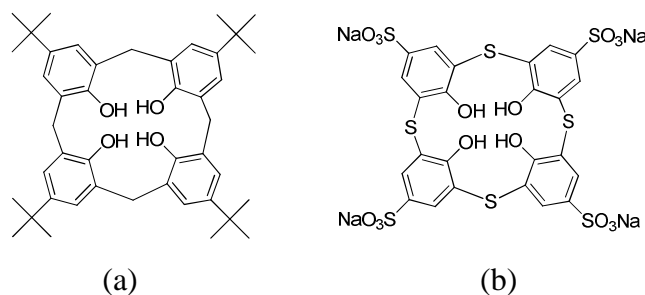


Figure 10 : (a) calix[4]arène avec des substituants *para-tert*-butyle, (b) structure du STCAS

#### *iv- Les hémicarcérands*

Alors que les carcérands encapsulent une molécule et ne la laisse plus ressortir même à très haute température, les hémicarcérands permettent l'entrée et la sortie d'une molécule à haute température et forment un complexe relativement stable à température ambiante. Ils ont une vitesse d'échange suffisamment lente à l'échelle de la RMN pour pouvoir être des systèmes hôtes prometteurs pour le xénon. L'hémicarcérand obtenu par Cram en 1991, constitué de deux tétramères aromatiques reliés par une chaîne pontante possède par exemple une constante d'affinité pour le xénon d'environ  $200 \text{ M}^{-1}$  dans le chloroforme à  $22^\circ\text{C}$  (Figure 11)<sup>33</sup>.

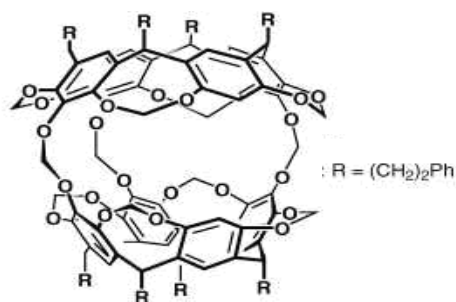


Figure 11 : hémicarcérand encapsulant le xénon

#### *v- Les cucurbiturils*

Les cucurbiturils sont des macrocycles composés d'unités glycoluril pontées par un méthylène (Figure 12a). Ils sont obtenus par réaction du glycoluril avec le formaldéhyde en milieu acide. Les cucurbit[n]uril (CB[n]) peuvent comporter 5 à 10 unités glycoluril et leur volume varie de

<sup>33</sup> D. J. Cram, M. E. Tanner, C. B. Knobler, *J. Am. Chem. Soc.*, **1991**, 113, 7717



82 à 870 Å<sup>3</sup>. Le plus petit cucurbituril, CB[5], qui devrait être le plus adapté pour l'encapsulation du xénon d'après les travaux de J. Rebek<sup>27</sup> est en fait trop rigide pour laisser entrer le xénon<sup>34</sup>. Le CB[6] est donc le meilleur de cette famille avec une constante d'affinité d'environ 200 M<sup>-1</sup> en milieu acide à 298 K<sup>35</sup>.

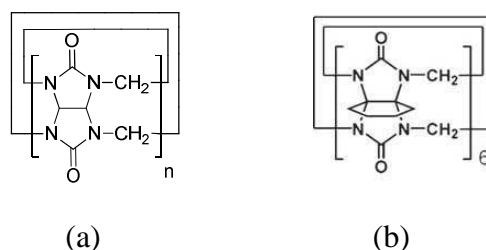


Figure 12 : (a) structure générale des cucurbit[n]urils, (b) structure du CB\*[6]

Récemment, le groupe de Kim a synthétisé un cucurbituril hydrosoluble CB\*[6] possédant une constante d'affinité pour le xénon de 3000 M<sup>-1</sup> mesurée par ITC (Figure 12b)<sup>36</sup>. Ce résultat est extrêmement prometteur.

### vi- Les cryptophanes

Les cryptophanes ont été découverts en 1981 par le groupe de Collet<sup>1</sup>. Ces molécules sont constituées de deux unités de dérivés de cyclotrivratriylène (CTV) reliées entre elles par des ponts alkyledioxy (Figure 13). La longueur des ponts et les substituants R<sub>1</sub> et R<sub>2</sub> des cycles aromatiques peuvent varier. Ils présentent une cavité hydrophobe adaptée à l'encapsulation du xénon et ont à ce jour les meilleures constantes d'affinité (2,9 × 10<sup>4</sup> M<sup>-1</sup> pour le cryptophane-111 hydrosoluble<sup>37</sup>) et des vitesses d'échange tout à fait adaptées.

<sup>34</sup> Y. Miyahara, K. Abe, T. Inazu, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2002**, 41, 3020

<sup>35</sup> M. El Haouaj, M. Luhmer, Y. Ho Ko, K. Kim, K. Bartik, *J. Chem. Soc., Perkin Trans.*, **2001**, 2, 804

<sup>36</sup> B. S. Kim, Y. H. Ko, Y. Kim, H. J. Lee, N. Selvapalam, H.C. Lee, K. Kim, *Chem Commun*, **2008**, 2756

<sup>37</sup> R. M. Fairchild, A. I. Joseph, K. Travis Holman, H. A. Fogarty, T. Brotin, J.-P. Dutasta, C. Boutin, G. Huber, P. Berthault, *J. Am. Chem. Soc.*, **2010**, 132, 15505

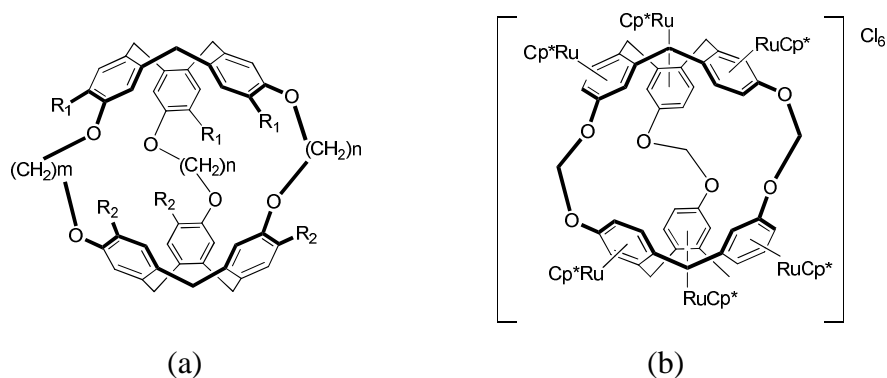


Figure 13 : (a) structure générale des cryptophanes; (b) cryptophane-111 hydrosoluble fonctionnalisé avec 6  $[(\eta^5\text{-C}_5\text{Me}_5)\text{Ru}^{\text{II}}]^+$   $[\text{Cp}^*\text{Ru}]^+$ <sup>37</sup>

Les propriétés d'encapsulation des différents cryptophanes testés seront détaillées par la suite.

#### f) Améliorer la sensibilité de l'IRM $^{129}\text{Xe}$

##### *i- l'HYPER-CEST*

C'est en 2006 que groupe de Pines introduit le concept d'HYPER-CEST<sup>38</sup>.

Il s'agit d'exploiter l'existence d'un échange chimique entre le xénon libre (forme A) et le xénon en cage (forme B) (Figure 14). En effet, lorsqu'on envoie une impulsion longue à la fréquence de résonance du xénon encapsulé (vert), le xénon encapsulé est dépolarisé (rouge) et le signal RMN disparaît. Or, le xénon encapsulé étant en échange permanent avec le xénon libre, le xénon libre sera à son tour dépolarisé et le signal du xénon libre va également décroître.

Une telle méthode permet, lorsque le signal du xénon encapsulé n'est pas ou peu visible du fait de la faible concentration en biosonde, d'observer le phénomène de décroissance sur le signal toujours intense du xénon libre<sup>39</sup>.

<sup>38</sup> L. Schröder, T. J. Lowery, C. Hilty, D. E. Wemmer, A. Pines, *Science*, **2006**, 314, 446

<sup>39</sup> A. D. Sherry, M. Woods, *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, **2008**, 10, 391

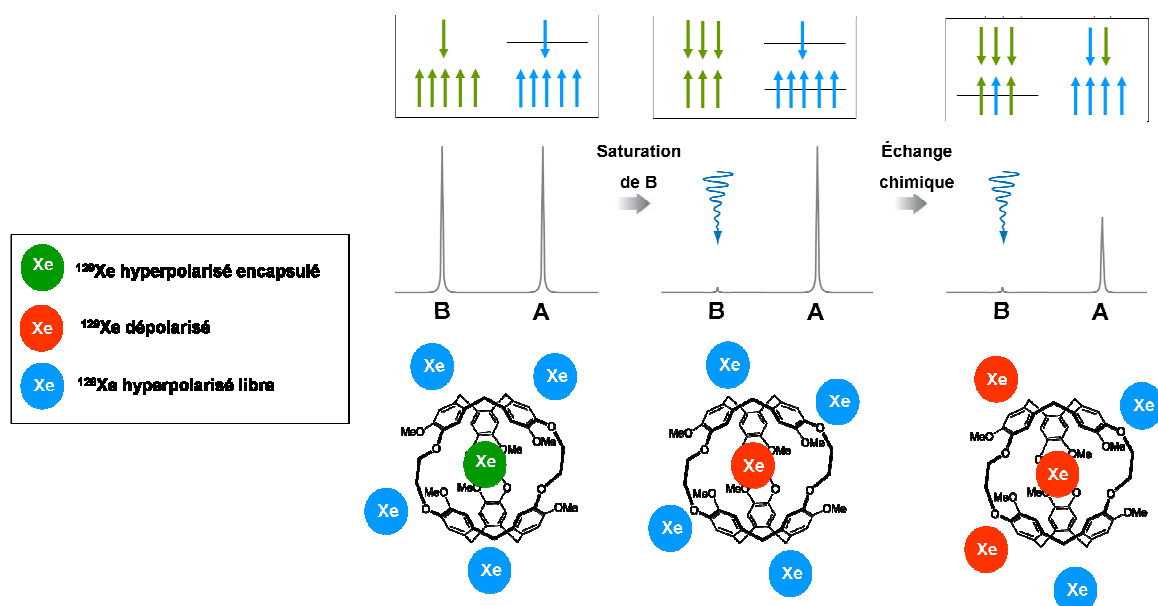


Figure 14 : principe de l'HYPER-CEST appliqué aux cryptophanes en RMN  $^{129}\text{Xe}$

Cette technique a été appliquée pour détecter la présence d'avidine grâce à un cryptophane décoré d'une biotine. Un tube comportant un lit d'agarose-avidine a été divisé en deux compartiments. (Figure 15a): seul le compartiment 2 (carré rouge) contient la biosonde (concentration de 5  $\mu\text{M}$ ), le compartiment 1 (carré bleu) sert de témoin. En absence de saturation, le signal RMN du xénon libre est d'intensité égale dans les deux compartiments (spectre b) et l'image e montre la présence de xénon libre dans tout le tube. Lorsqu'une saturation à la fréquence de résonance du xénon encapsulé est appliquée, le signal du xénon libre disparaît seulement dans le compartiment 2 contenant la biosonde (spectre c et image f). Une soustraction des signaux obtenus avant et après saturation (spectre d) permet d'obtenir la localisation de la biosonde (image g).

Cette méthode permet de détecter des concentrations en biosonde de l'ordre de quelques dizaines de nanomolaires, voire même quelques centaines de picomolaires<sup>40</sup>. Par ailleurs, une étude portant sur l'utilisation optimisée d'une telle méthode a été publiée récemment par l'équipe de Schröder<sup>41</sup>.

<sup>40</sup> L. Schröder, *Physica Medica*, **2011**, doi:10.1016/j.ejmp.2011.11.001

<sup>41</sup> M. Kunth, J. Döpfert, C. Witte, F. Rossella, L. Schröder, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2012**, doi:10.1002/anie.201202481

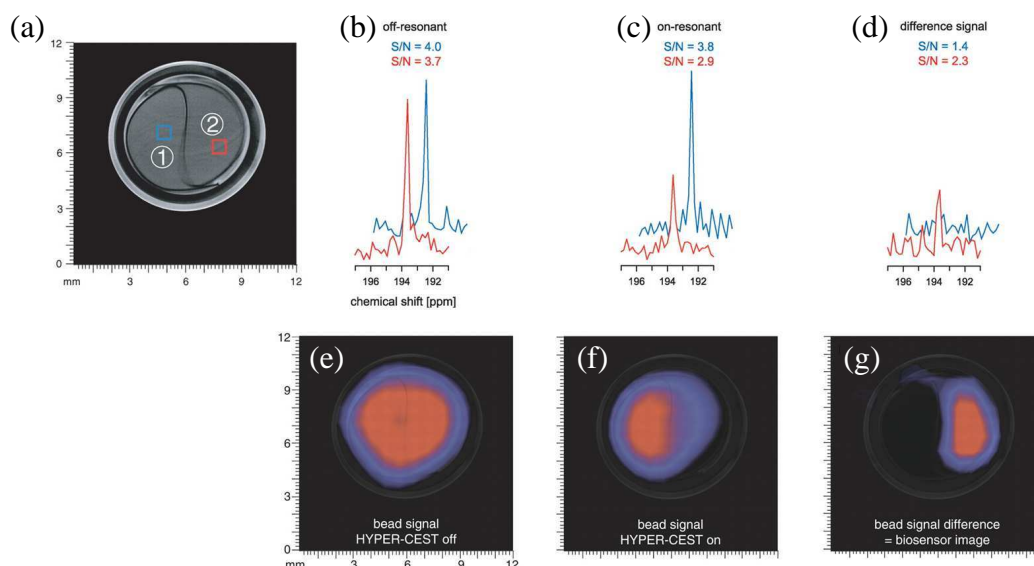


Figure 15 : application de la technique d' l'HYPER-CEST (a) lit d'agarose – avidine séparé en deux compartiments : (1) témoin, (2) avec la biosonde. (b) et (c) spectres RMN  $^{129}\text{Xe}$  respectivement sans et avec saturation (en bleu: compartiment 1, en rouge : compartiment 2). (d) spectre RMN  $^{129}\text{Xe}$  obtenu après soustraction de (b) et (c). (e) et (f) image IRM  $^{129}\text{Xe}$  respectivement sans et avec saturation. (g) image obtenue après soustraction de (e) et (f).

## ii- Augmentation de la concentration locale en sonde

Une autre méthode qui permet d'améliorer la sensibilité de l'IRM  $^{129}\text{Xe}$  consiste à introduire des plateformes capables de présenter plusieurs cryptophanes afin d'augmenter la concentration locale en xénon encapsulé.

En 2006, Pines et Fréchet<sup>42</sup> développent des dendrimères polyamidoamines capables d'attacher de manière non covalente entre 3 et 11 cryptophanes. L'absence de liaison covalente se traduit par un manque de stabilité mais présente l'avantage d'éviter des synthèses lourdes. La version biotinylée de ce dendrimère montre une amplification de la hauteur de pic d'un facteur 8 comparée à la biosonde d'origine. Ce facteur 8 provient, d'une part de la présence de deux cryptophanes par unité, d'autre part par l'absence de diastéréoisomères, et finalement d'une vitesse d'entrée et de sortie plus rapide qui se traduit par un pic plus fin.

Une seconde approche est introduite par l'équipe de Pines<sup>43</sup> en 2010 en s'inspirant d'une stratégie développée pour des agents de contraste paramagnétiques qui utilise une capsid virale<sup>44,45</sup>. Celle-ci est une structure quasi-sphérique contenant 32 pores d'environ 2 nm de

<sup>42</sup> J. L. Mynar, T. J. Lowery, D. E. Wemmer, A. Pines, J. M. J. Fréchet, *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, *128*, 6334

<sup>43</sup> T. Meldrum, K. L. Seim, V. S. Bajaj, K. K. Palaniappan, W. Wu, M. B. Francis, D. E. Wemmer, A. Pines, *J. Am. Chem. Soc.*, **2010**, *132*, 5936

<sup>44</sup> J. M. Hooker, A. Datta, M. Botta, K. N. Raymond, M. B. Francis, *Nano Lett.*, **2007**, *7*, 2207

<sup>45</sup> A. Datta, J. M. Hooker, M. Botta, M. B. Francis, S. Aime, K. N. Raymond, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 2546

diamètre chacun. Elle est composée de 180 monomères qui s'auto-assemblent spontanément en un transporteur non infectieux, hydrosoluble et biocompatible. Une telle structure peut être aisément décorée de 125 cryptophanes, ce qui permet de descendre la limite de détection à 0,7 pM de sonde en appliquant la méthode d'HYPER-CEST. Le signal RMN est cependant élargi à cause de la mobilité réduite des cryptophanes. Ces composés restent tout de même très prometteurs et pourront être fonctionnalisés afin de se greffer spécifiquement à des cibles d'intérêt.

Dernièrement, la même équipe a également publié l'utilisation du bactériophage M13 comme support supramoléculaire pour le greffage d'un millier de cryptophane-A<sup>46</sup>. Cette nouvelle structure a permis de détecter une concentration de 230 fM en agent HYPER-CEST, une sensibilité jamais atteinte pour un agent de contraste IRM.

### g) Visualiser plusieurs phénomènes biologiques en même temps

La grande sensibilité du xénon permet de différencier simultanément des milieux relativement proches (multiplexing). Cette possibilité a été mise en valeur par l'équipe de Berthault en 2008<sup>47</sup>. Dans ces travaux, deux cryptophanes peuvent être détectés puis imagés dans deux environnements différents avec de bonnes résolutions spatiales (Figure 16).

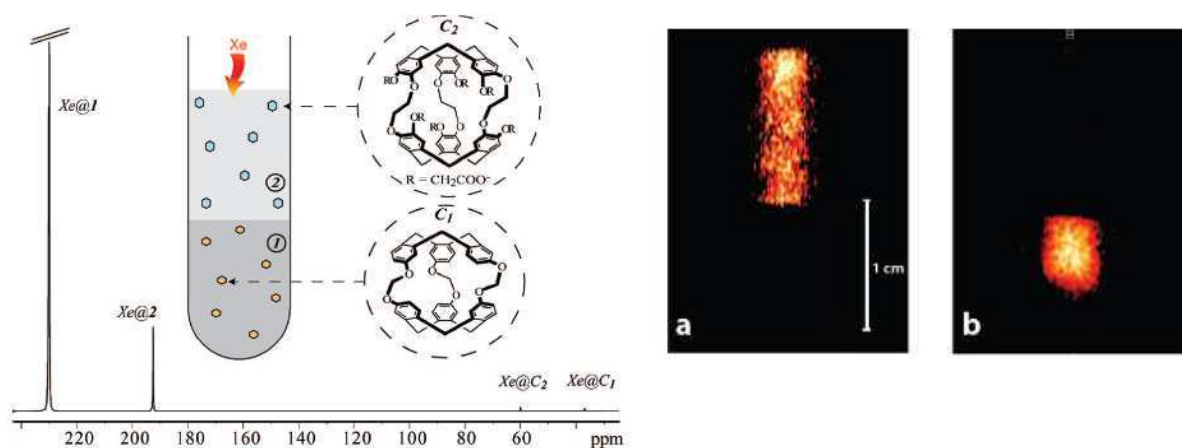


Figure 16<sup>47</sup> : tube contenant 200  $\mu\text{L}$   $(\text{CHCl}_2)_2/(\text{CDCl}_2)_2$  (1:14) dans la phase inférieure, 300  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$  (1:14) dans la phase supérieure, 43  $\mu\text{g}$  de composé  $\text{C}_1$ , et 110  $\mu\text{g}$  de  $\text{C}_2$ . Spectre  $^{129}\text{Xe}$  obtenu en 1 scan avec 1 atm de gaz hyperpolarisé (a) Image  $^{129}\text{Xe}$  du xénon encapsulé dans le cryptophane  $\text{C}_2$  (dans  $\text{D}_2\text{O}$ ) (b) Image  $^{129}\text{Xe}$  du xénon encapsulé dans le cryptophane  $\text{C}_1$  (dans  $(\text{CDCl}_2)_2$ )

<sup>46</sup> T. K. Stevens, K. K. Palaniappan, R. M. Ramirez, M. B. Francis, D. E. Wemmer, A. Pines, *Magn. Reson. Med.*, **2012**, doi:10.1002/mrm.24371

<sup>47</sup> P. Berthault, A. Bogaert-Buchmann, H. Desvaux, G. Huber, Y. Boulard, *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, *130*, 16456

## B. Les cryptophanes

### 1. Les dérivés de cyclotrivéatrylène

En 1915, Robinson reporte pour la première fois l'obtention du cyclotrivéatrylène (CTV, Figure 17). Le produit, à l'époque, avait été identifié à tort comme étant le 2,3,6,7-tétraméthoxy-9,10-dihydroanthracène<sup>48</sup>. C'est en 1965, à la suite des travaux de Lindsey<sup>49</sup>, d'Erdtman<sup>50</sup> et de Goldup<sup>51</sup> que la structure des CTV a pu être clairement identifiée.

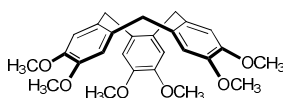


Figure 17 : structure du cyclotrivéatrylène

L'appellation générale de ces molécules composées de trois noyaux aromatiques reliés par des ponts méthylène est tribenzo(a, d, g)cyclononatriène (Figure 18).

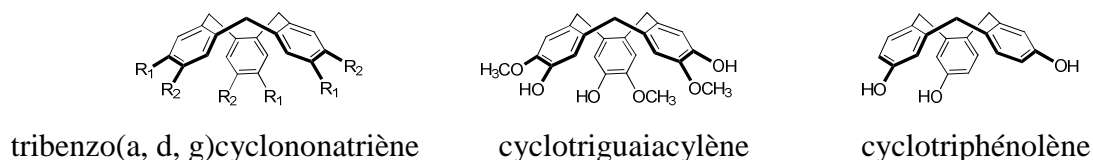


Figure 18 : dérivés de cyclotrivéatrylène

Par la suite, on effectuera un abus de langage en appelant CTV tous les dérivés de cyclotrivéatrylène.

#### a) Synthèse de CTV

Il existe deux grandes méthodes d'obtention de CTV.

<sup>48</sup> G. M. Robinson, *J. Chem. Soc.*, **1915**, 102, 266

<sup>49</sup> A. S. Lindsey, *J. Chem. Soc.*, **1965**, 1685

<sup>50</sup> H. Erdtman, F. Haglid, R. Ryhage, *Acta. Chem. Scand.*, **1964**, 18, 1249

<sup>51</sup> A. Goldup, A. B. Morrison, G. W. Smith, *J. Chem. Soc.*, **1965**, 3864

Une première consiste à mettre en présence des dérivés du vétratole avec du formaldéhyde en milieu acide (Figure 19).

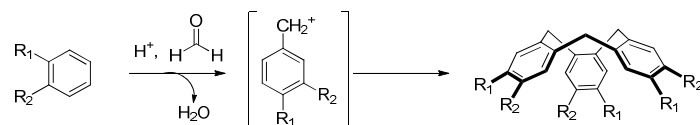


Figure 19 : synthèse de CTV à partir de dérivé de vétratole et du formaldéhyde

La deuxième consiste à générer le cation benzylique intermédiaire à partir d'alcools benzyliques en milieu acide. Il s'agit de la méthode la plus répandue actuellement pour l'obtention de divers CTV (Figure 20).

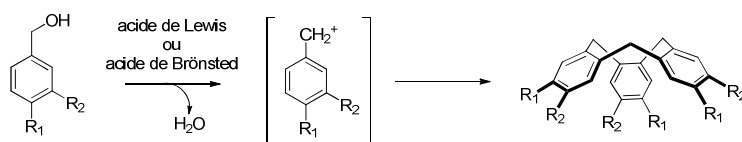


Figure 20 : synthèse de CTV à partir d'alcool benzylique substitué

Le mécanisme envisagé (Figure 21) pour ces cyclotrimérisations passe par la formation d'un carbocation stabilisé qui permet successivement de former le dimère, puis le trimère avant de permettre la cyclisation finale pour obtenir le CTV<sup>52</sup>.

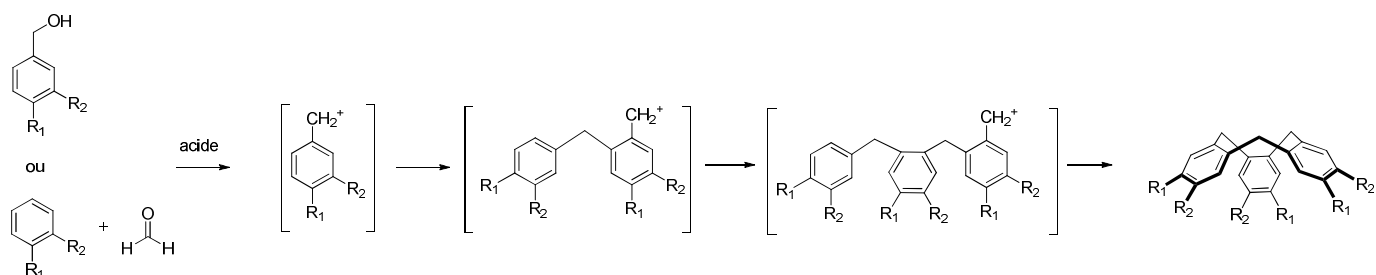


Figure 21 : mécanisme proposé pour la formation de CTV

Pour que les réactions de cyclotrimérisations soient efficaces, il est nécessaire d'avoir un groupement électrodonneur en R<sub>2</sub>, pour activer la position en para de ce groupement, ainsi qu'un groupement protecteur en R<sub>1</sub> afin d'éviter les substitutions électrophiles en cette position (Figure 22).

<sup>52</sup> A. Collet, *Tetrahedron*, **1987**, 43, 5725

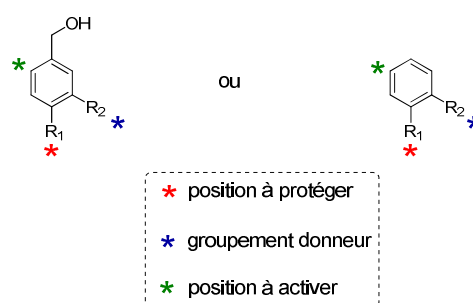


Figure 22 : protection et activation de l'alcool benzylique de départ

L'acide choisi dépend du composé à cycliser, il peut s'agir d'acides de Brønsted ( $\text{HClO}_4$ ,  $\text{HCOOH}$ ,  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) comme d'acides de Lewis ( $\text{P}_2\text{O}_5$ ,  $\text{Sc}(\text{OTf})_3$  catalytique).

Quelle que soit la méthode employée, la synthèse de CTV s'accompagne en général par la formation d'oligomères cycliques, dont le cyclotétravératrylène majoritaire (Figure 23)<sup>53</sup>.

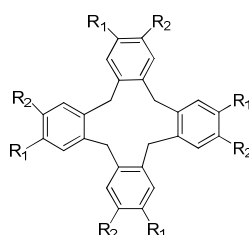


Figure 23 : structure générale du CTTV

### b) Symétrie et chiralité des CTV

Le cyclotrivératrylène est une molécule achirale. Cependant, si les substituants  $\text{R}_1$  et  $\text{R}_2$  sont différents sur le cyclononatriène, la molécule devient chirale. Les propriétés de symétrie des composés dépendent de la voie de synthèse. En effet, à partir de vératroles substitués par deux groupements différents, il est possible de former deux cations régioisomères (Figure 24). Ces cations vont conduire à deux paires d'énantiomères de symétrie respective  $\text{C}_1$  et  $\text{C}_3$ . La symétrie  $\text{C}_1$  est obtenue par des condensations croisées des deux carbocations (voie A). La symétrie  $\text{C}_3$  est obtenue par trois condensations successives d'un même cation (voie B).

<sup>53</sup> J. D. White, B.D. Gesner, *Tetrahedron*, **1974**, 30, 2273



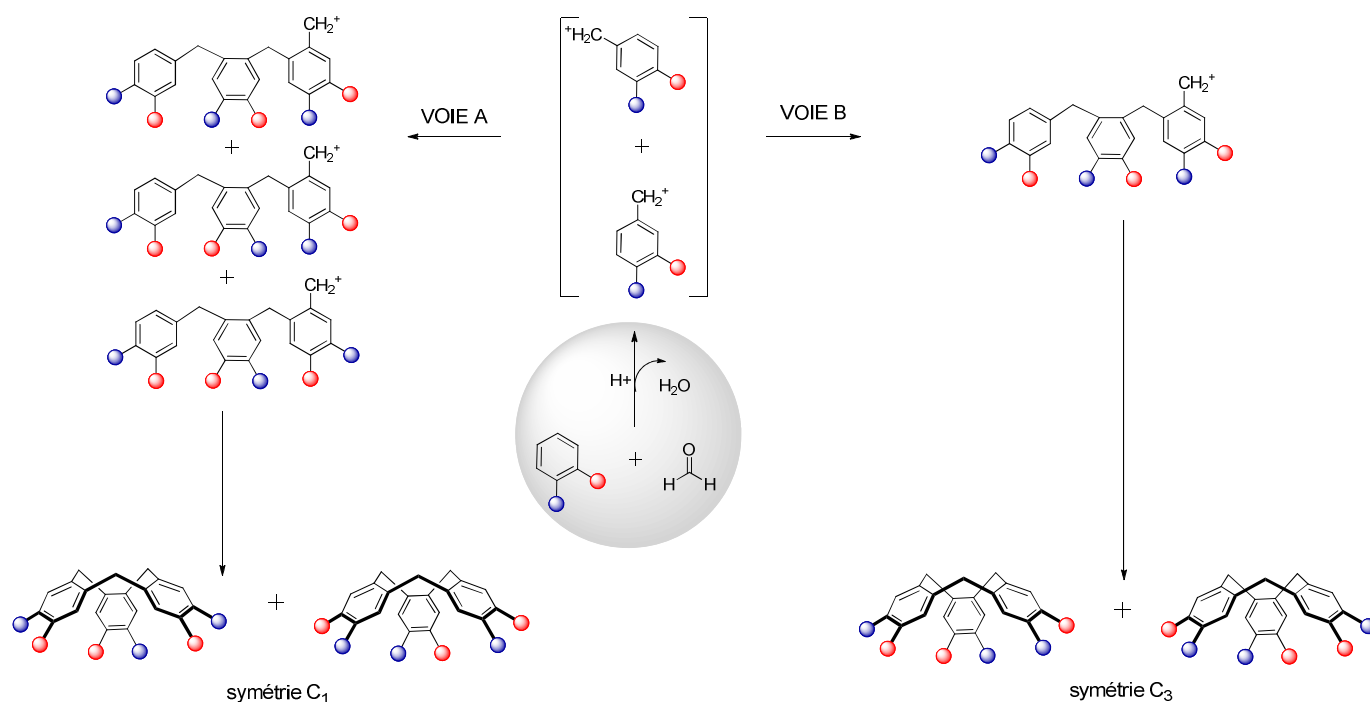


Figure 24 : symétrie des CTV obtenus à partir de dérivés du vétratole

Dans le cas de la synthèse à partir de l'alcool benzylique, seul un carbocation est formé, ce qui mènera à une paire d'énantiomères de symétrie C<sub>3</sub> (Figure 25).

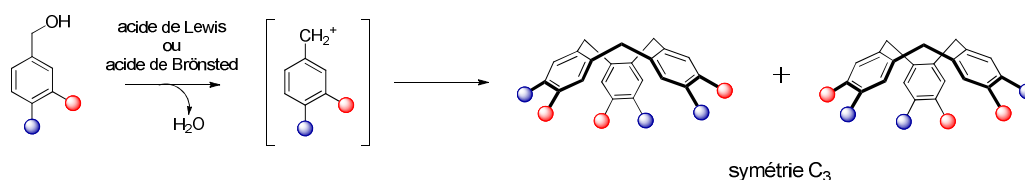


Figure 25 : symétrie des CTV obtenus à partir de dérivé d'alcool benzylique

Des CTV énantiomériquement purs peuvent être obtenus par introduction d'un substituant chiral (avant<sup>54,55</sup> ou après<sup>56,57,58</sup> cyclotrimérisation), séparations des diastéréoisomères obtenus par chromatographie puis clivage des groupements chiraux.

<sup>54</sup> A. Collet, J. Jacques, *Tetrahedron Lett.*, **1978**, 1265

<sup>55</sup> A. Collet, J. Gabard, J. Jacques, M. Cesario, J. Guilhem, C. Pascard, *J. Chem. Soc., Perkin Trans.*, **1981**, 1, 1630

<sup>56</sup> J. Canceill, A. Collet, J. Gabard, G. Gottarelli, G. P. Spada, *J. Am. Chem. Soc.*, **1985**, 107, 1299

<sup>57</sup> J. Canceill, A. Collet, G. Gottarelli, *J. Am. Chem. Soc.*, **1984**, 106, 5997

<sup>58</sup> J. Canceill and A. Collet, *Nouv. J. Chim.*, **1986**, 10, 17

### c) Conformations des CTV

Les CTV énantiomériquement purs peuvent racémiser par une interconversion "*crown to crown*" en passant par des conformations intermédiaires "*saddle*" et "*twistée*" (Figure 26). Ces composés sont en général moins stables que la conformation "couronne" à cause d'interactions répulsives existant entre un groupement méthylène et un cycle aromatique opposé<sup>52</sup>.

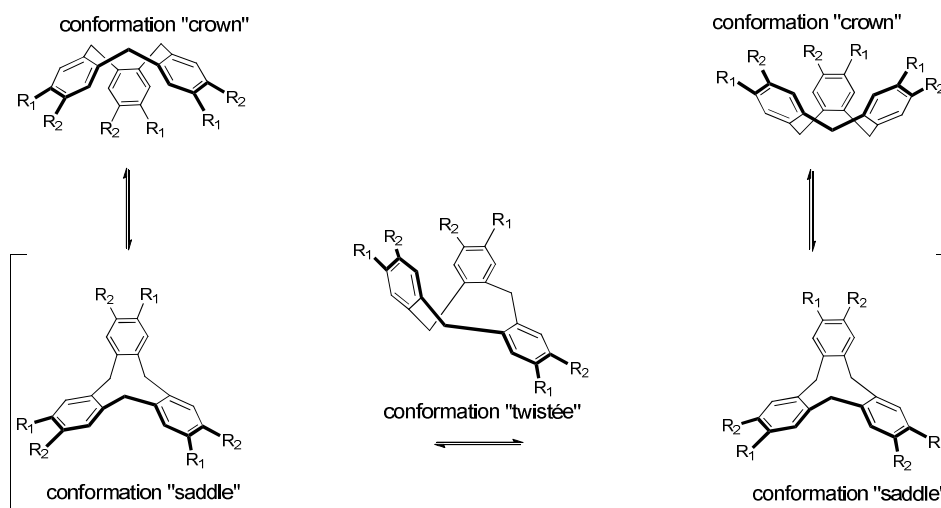


Figure 26 : différentes conformations du CTV

Le temps de demi-vie d'un conformère unique est de l'ordre de 3 ans à 0 °C, 1 mois à 20 °C et quelques minutes à 100 °C<sup>52</sup>. La barrière d'énergie d'inversion est de l'ordre de 26 kcal.mol<sup>-1</sup>.

Les conformations intermédiaires de type saddle peuvent être isolées dans le cas de CTV modifiés sur les ponts méthylène ou particulièrement encombrés au niveau des cycles aromatiques (Figure 27).

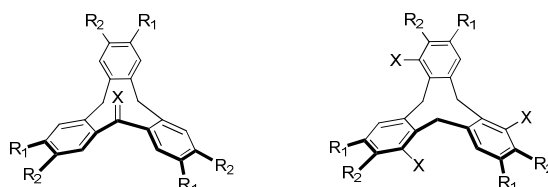


Figure 27 : exemple de CTV stables en conformation *saddle*

## 2. Les cryptophanes

### a) Stéréochimie des cryptophanes

Les CTV étant chiraux, deux configurations sont possibles pour les cryptophanes. Si les deux unités de CTV jointes sont identiques, on obtiendra la configuration *anti*. Si les deux unités de CTV sont énantiomères, le cryptophane obtenu sera *syn*<sup>52, 59, 60</sup>. Il existe au final trois stéréoisomères de configuration (Figure 28).

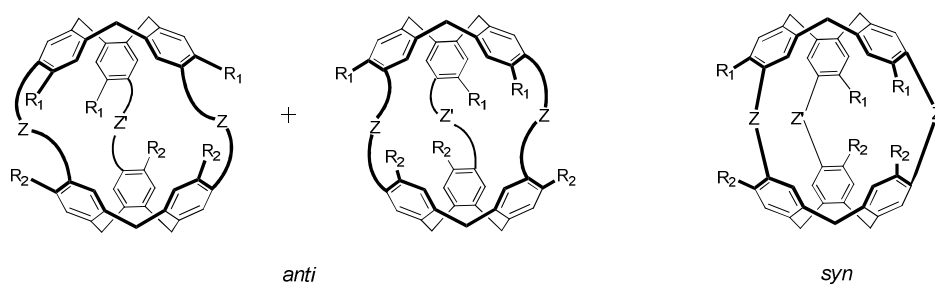


Figure 28 : configurations *syn* et *anti*

Les deux cryptophanes *anti* sont chiraux et énantiomères entre eux. Le cryptophane *syn* peut être soit achiral si  $R_1 = R_2$ , soit chiral si  $R_1 \neq R_2$ .

En termes de symétrie :

Si  $R_1 = R_2$  et  $Z = Z'$ , la forme *syn* est de symétrie  $C_{3h}$  alors que la forme *anti* possède une symétrie  $D_3$ .

Si  $R_1 = R_2$  et  $Z \neq Z'$ , la forme *syn* est de symétrie  $C_s$  alors que la forme *anti* possède une symétrie  $C_2$ .

Si  $R_1 \neq R_2$  et  $Z = Z'$ , les formes *syn* et *anti* sont de symétrie  $C_3$ .

Si  $R_1 \neq R_2$  et  $Z \neq Z'$ , les formes *syn* et *anti* sont de symétrie  $C_1$ .

<sup>59</sup> T. Brotin, J.-P. Dutasta, *Chem. Rev.*, **2009**, 109, 88

<sup>60</sup> K. T. Holman, *Encyclopedia of Supramolecular Chemistry*, **2004**

### b) Conformations des cryptophanes

Il est possible d'observer des changements de conformation pour des cryptophanes de grande taille de cavité. Différentes inversions au niveau des CTV conduisent à quatre cryptophanes topoisomères (Figure 29) :

- une conformation *out/out*, lorsque les deux CTV sont en conformation couronne et pointent les ponts méthylènes vers l'extérieur.
- une conformation *in/out*, lorsqu'un des deux CTV en conformation couronne pointe ses ponts méthylènes vers la cavité de la molécule cage.
- une conformation *in/in*, lorsque les deux CTV en conformation couronne pointent leurs ponts méthylènes vers la cavité de la molécule cage.
- une conformation *out/saddle* (ou selle de cheval), lorsqu'un des deux CTV est en conformation selle de cheval (Figure 26).

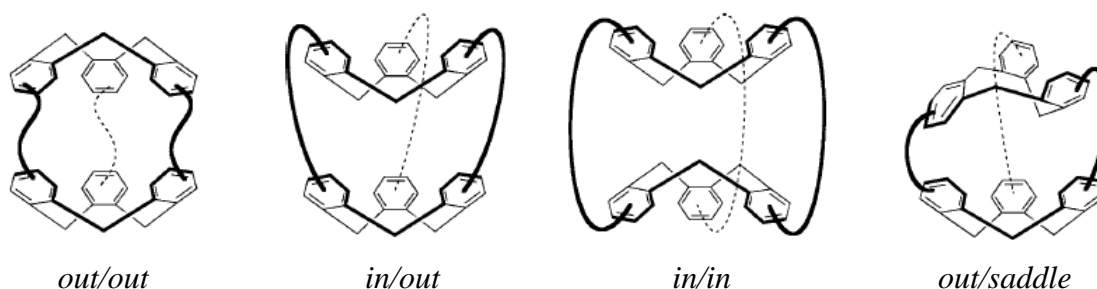


Figure 29 : différentes conformations du cryptophane

Il est possible d'obtenir une conformation *out/out* à partir des composés qui possèdent une conformation *in/out*, *in/in* ou *out/saddle* lorsque, après solubilisation, ceux-ci sont chauffés ou mis en présence de gaz pouvant être encapsulé au sein de leur cavité.

### c) Synthèse de cryptophanes

Il existe trois grandes méthodes de synthèse de cryptophanes<sup>61,52,59,60</sup> (Figure 30). Toutes ont comme produit de départ des dérivés d'alcools benzyliques.

<sup>61</sup> A. Collet, J.-P. Dutasta, B. Lozach, J. Canceill, *Topics in Current Chemistry*, **1993**, 165

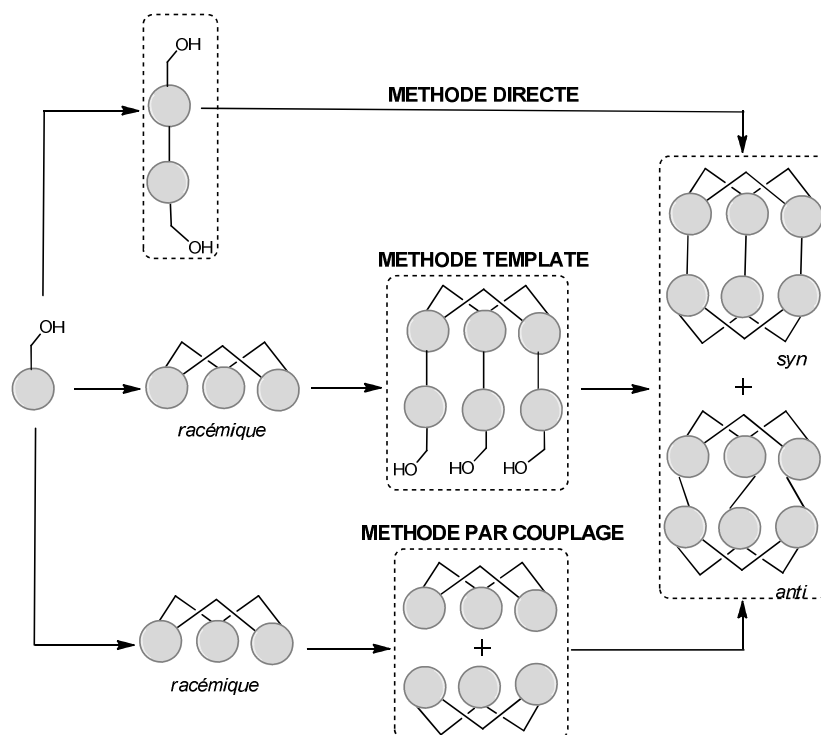


Figure 30 : les trois méthodes de synthèse des cryptophanes

#### *i- La méthode directe*

La première méthode consiste à former d'abord un dimère d'alcool benzylique pour le cyclotrimériser ensuite en conditions acide (Figure 31). Cette réaction met en jeu le couplage de trois dimères en créant six liaisons carbone-carbone en une seule étape.

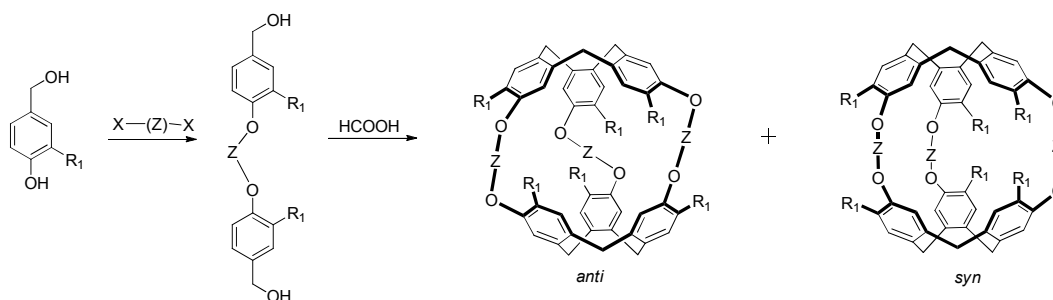


Figure 31 : schéma de synthèse général par la méthode directe

Cette approche a l'avantage d'être courte, et permet d'obtenir des cryptophanes avec des ponts divers pouvant aller jusqu'à sept carbones. Cependant, elle est restreinte à la formation de

composés de symétrie  $D_3$  ou  $C_{3h}$  et les rendements sont souvent relativement faibles (Tableau 2).

O-(Z)-O	Anti (%)	Syn(%)
$(CH_2)_2$	5	0
$(CH_2)_3$	17	3
$(CH_2)_4$	8	2
$(CH_2)_5$	12	6
$(CH_2)_6$	8	2
$(CH_2)_7$	5	1
$(CH_2)_8$	0	0
$CH_2CH=CHCH_2$ ( <i>E</i> )	5	1
$CH_2CH=CHCH_2$ ( <i>Z</i> )	10	8
$CH_2C\equiv CCH_2$	0	0

Tableau 2 : rendement des isomères *anti* et *syn* obtenus par la méthode directe ( $R_1 = OCH_3$ )

Dans cette méthode, il semble que la formation de cryptophane *anti* soit favorisée. Les intermédiaires probables de cette réaction sont présentés dans la Figure 32.

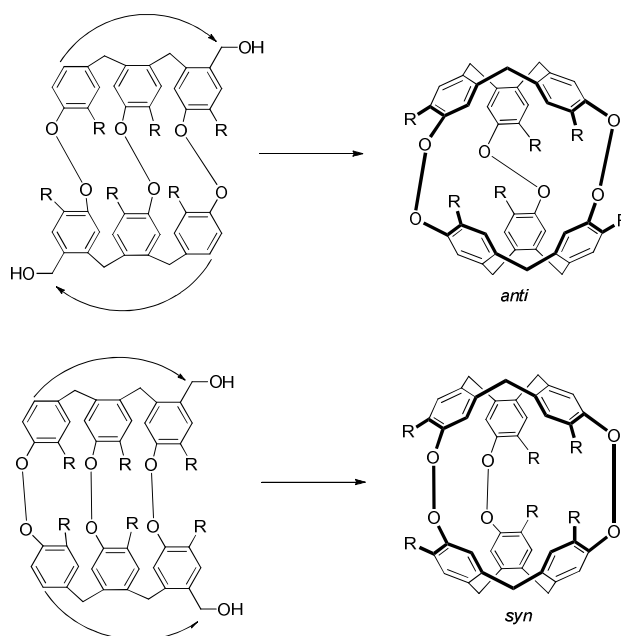


Figure 32 : intermédiaires probables pour les cryptophanes *syn* et *anti* par la méthode directe

Cette approche a été utilisée par Holman pour synthétiser un cryptophane anti présentant des ponts *m*-xylylène substitué par un ester permettant l'encapsulation d'une molécule de THF (Figure 33)<sup>62</sup>.

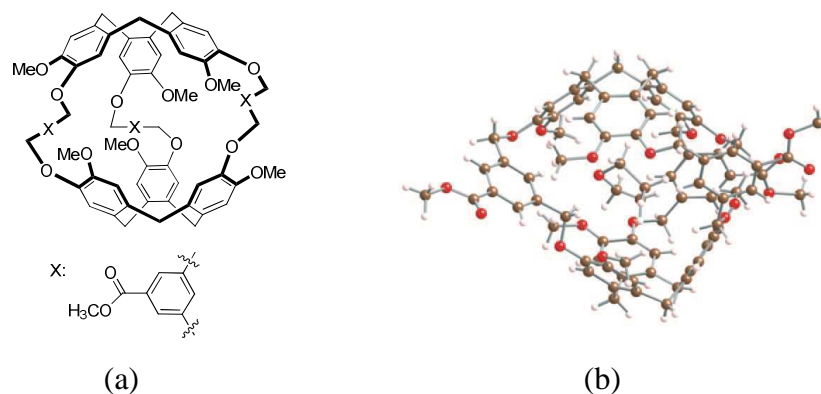


Figure 33 : (a) cryptophane avec des ponts des ponts *m*-xylylène substitué par un ester (b) structure RX du cryptophane encapsulant une molécule de THF

### ii- La méthode template

Il s'agit de l'approche utilisée par le groupe de Collet pour la première synthèse de cryptophanes (Figure 34).

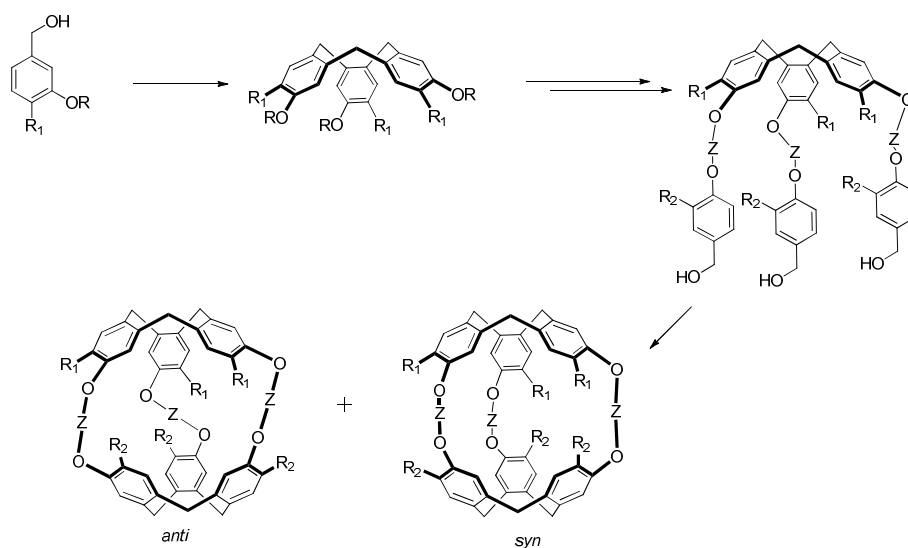


Figure 34 : schéma général de synthèse des cryptophanes par la méthode template

<sup>62</sup> S. T. Mough, J. C. Goeltz, K. T. Holman, *Angew. Chem.*, **2004**, 43, 5631

L'alcool benzylique est dans ce cas directement cyclotrimérisé pour former un CTV. Ce dernier est fonctionnalisé avec des dérivés d'alcool benzyliques pour préformer une cage qui servira de "template" pour la fermeture de cycle. La dernière étape consiste en la cyclotrimérisation intramoléculaire en milieu acide dilué. Les rendements de synthèse sont souvent bien meilleurs que ceux obtenus par la méthode directe (Tableau 3).

O-(Z)-O	Anti (%)	Syn(%)
(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>	80	0
(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub>	27	50
(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub>	-	-
(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub>	21	43
(CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub>	18	9
(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub>	-	-
(CH <sub>2</sub> ) <sub>8</sub>	60	20
CH <sub>2</sub> CH=CHCH <sub>2</sub> ( <i>E</i> )	34	5
CH <sub>2</sub> CH=CHCH <sub>2</sub> ( <i>Z</i> )	25	50
CH <sub>2</sub> C≡CCH <sub>2</sub>	43	20

Tableau 3 : rendement des isomères *anti* et *syn* par la méthode template ( $R_1 = R_2 = \text{OCH}_3$ )

Le rapport *syn/anti* dépend de la parité du nombre de carbones du bras entre les deux CTV : si le nombre de carbone est pair, on observera majoritairement du cryptophane *anti* et si le nombre d'atome est impair on obtiendra majoritairement du *syn*. En effet, la parité du nombre de carbone au niveau du bras va déterminer l'orientation de la fonction alcool réactive de l'alcool benzylique et donc le sens de cyclisation (dans le sens ou dans le sens inverse des aiguilles d'une montre (Figure 35)).

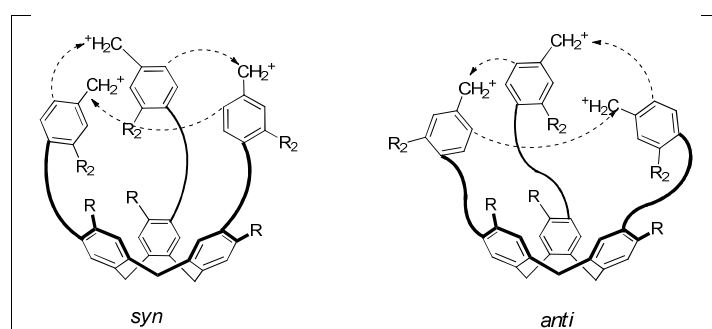


Figure 35 : intermédiaires probables pour les cryptophanes *syn* et *anti* par la méthode template



La méthode template permet d'obtenir des cryptophanes de symétrie  $D_3$  et  $C_{3h}$  comme le cryptophane-A et le cryptophane-E *syn* mais aussi des composés d'autres symétries comme le cryptophane-C (symétrie  $C_3$ ) ou des cryptophanes de symétrie  $C_2$  (Figure 36).

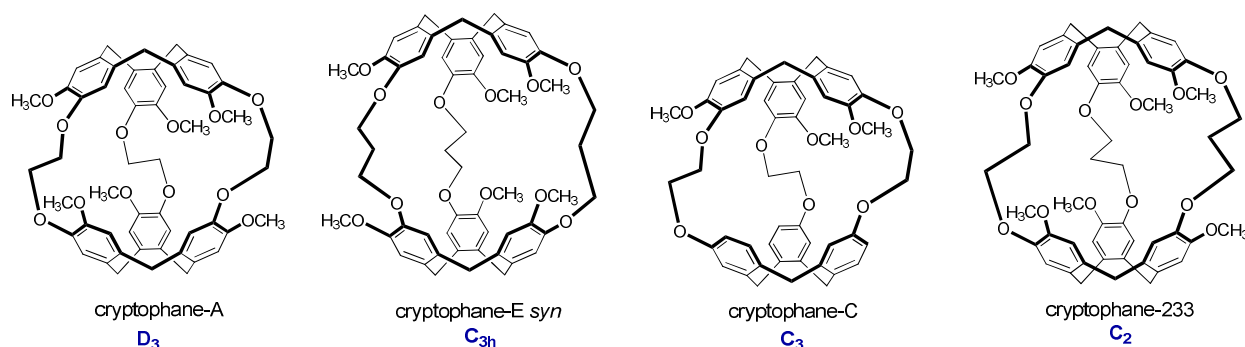


Figure 36 : cryptophanes de symétrie  $D_3$ ,  $C_{3h}$ ,  $C_3$  et  $C_2$

### iii- La méthode par couplage

Cette approche permet de synthétiser des cryptophanes par couplage de deux sous-unités cyclotrivratriylènes. Elle a été décrite pour la première fois par l'équipe de Cram en 1991 qui a publié la synthèse d'un cryptophane dans lequel chaque chaîne pontante possède deux fonctions alcynes. Les cryptophanes *syn* (**9**) et *anti* (**8**) sont obtenus avec de faibles rendements de 2 % et 4 % respectivement, à partir de deux CTV identiques en présence d'acétate de cuivre (Figure 37)<sup>63</sup>.

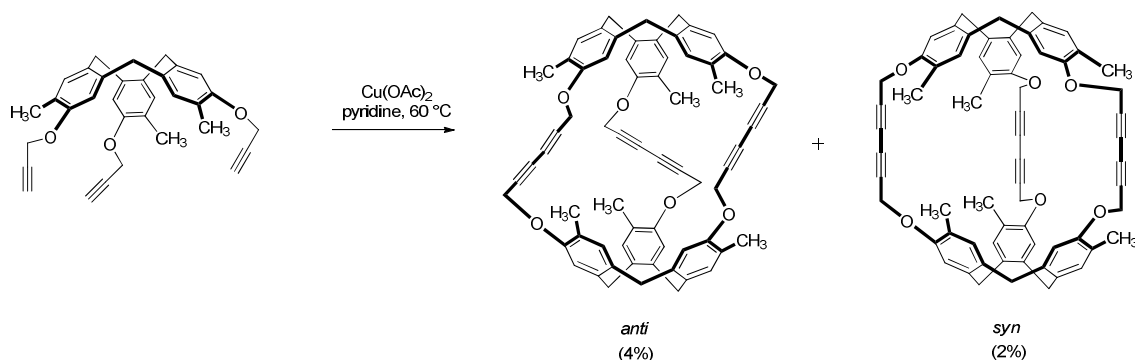


Figure 37 : synthèse de cryptophanes possédant des fonctions diynes

<sup>63</sup> D. Cram, M. Tanner, S. Keipert, C. Knobler, *J. Am. Chem. Soc.*, **1991**, *113*, 8909

Cette méthode a été utilisée pour la synthèse du cryptophane-111 à partir de deux unités de cyclotriphénolène (Figure 38)<sup>64</sup>.

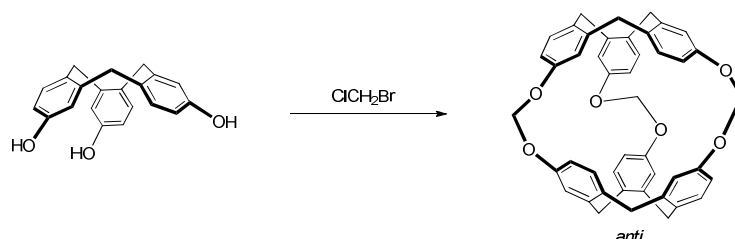


Figure 38 : synthèse du cryptophane-111 par la méthode de couplage

Elle a été aussi appliquée pour la synthèse du cryptophane-000 par couplage oxydant entre deux unités de cyclotrithiophénolène (Figure 39)<sup>65</sup>.

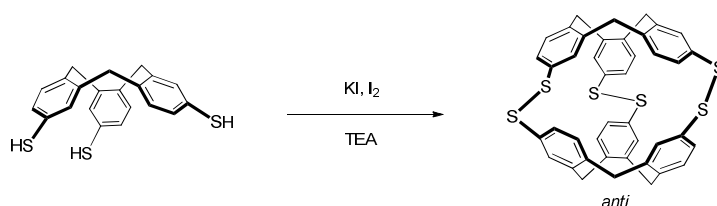


Figure 39 : synthèse du cryptophane-000 par la méthode de couplage

#### d) Fonctionnalisation de cryptophanes

Nous synthétisons des cryptophanes dans le but de faire des biosondes. Pour cela, il est souvent nécessaire de fonctionnaliser les molécules cages afin de les rendre hydrosolubles, spécifiques, ou biocompatibles. Différentes stratégies de synthèse sont alors possibles.

##### *i- Synthèse et fonctionnalisation de cryptophanes-222*

Toutes les biosondes décrites jusqu'à présent sont des cryptophanes de type 222 quasiment tous synthétisés à partir du CTV 1 (Figure 40).

<sup>64</sup> H. Fogarty, P. Berthault, T. Brotin, G. Huber, H. Desvaux, J.-P. Dutasta, *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, 129, 10332

<sup>65</sup> M. A. Little, J. Donkin, J. Fisher, M. A. Halcrow, J. Loder, M. J. Hardie, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2011**, 50, 764

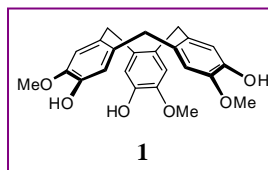


Figure 40 : CTV **1**

Ce composé est obtenu en trois étapes linéaires à partir de l'alcool vanillique **2**, avec un rendement compris entre 30 et 45 % (Figure 41). Le phénol est d'abord protégé par une fonction allyle, ce qui permet de le cyclotrimériser dans l'acide perchlorique avec un rendement d'environ 60 %. La réaction de cyclisation ne marche pas ou peu avec la fonction phénol non protégée. Il reste ensuite à déallyler le CTV **4** en présence de palladium.

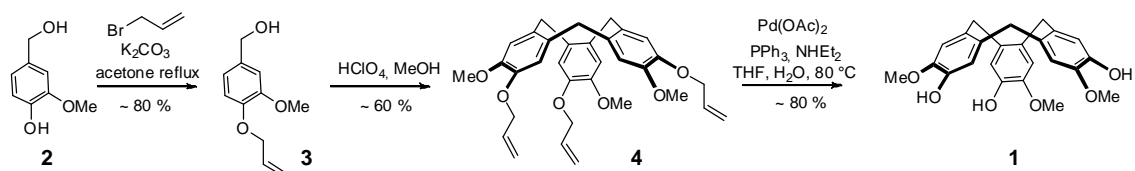


Figure 41 : synthèse du CTV **1**

#### 🚦 Cryptophanes monofonctionnalisés, précurseurs de biosonde

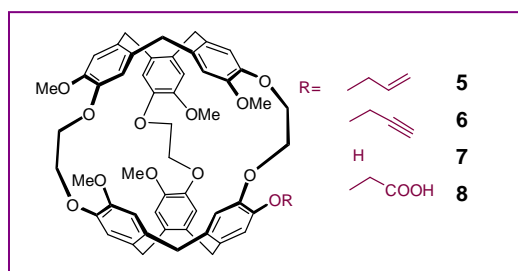


Figure 42 : cryptophanes monofonctionnalisés

Il s'agit de précurseurs développés par les équipes de Pines<sup>2</sup>, Dutasta et Brotin<sup>66</sup>, Dmochowski<sup>67</sup> et Freund<sup>68</sup> pour synthétiser leur biosonde (Figure 42).

<sup>66</sup> V. Roy, T. Brotin, J.-P. Dutasta, M.-H. Charles, T. Delair, F. Mallet, G. Huber, H. Desvaux, Y. Boulard, P. Berthault, *ChemPhysChem*, **2007**, 8, 2082

<sup>67</sup> Q. Wei, G. K. Seward, P. A. Hill, B. Patton, I. E. Dimitrov, N. N. Kuzma, I. J. Dmochowski, *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, 128, 13274

Les cryptophanes sont obtenus en trois étapes à partir du CTV **1**. Les deux premières étapes consistent à alkyler les phénols, soit par un monomère **11** et deux monomères **9** soit par deux monomères **9** puis un monomère **10**. La cyclotrimérisation intramoléculaire finale donne accès aux cryptophanes désirés (Figure 43).

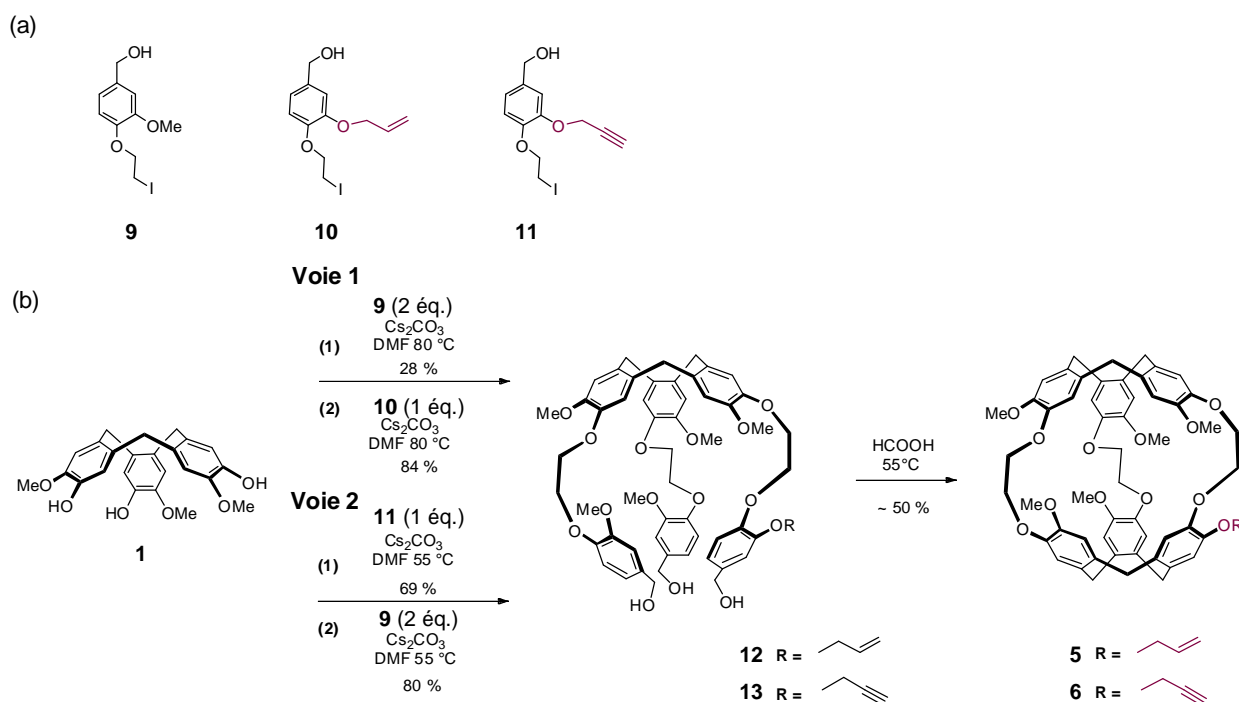


Figure 43 : (a) monomères **9**, **10**, **11** (b) synthèse des cryptophanes **5**, **6**

Le monomère **9** est obtenu en deux étapes à partir de **2** avec un rendement d'environ 58 % (Figure 44). Les monomères **10** et **11** sont synthétisés en quatre étapes à partir du dihydroxybenzaldéhyde **15** avec un rendement d'environ 40 %<sup>69</sup>.

<sup>68</sup> A. Schlundt, W. Kilian, M. Beyermann, J. Sticht, S. Gunther, S. Hopner, K. Falk, O. Roetzschke, L. Mitschang, C. Freund, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2009**, 48, 4142

<sup>69</sup> T. Brotin, J.-P. Dutasta, *Eur. J. Org. Chem.*, **2003**, 973

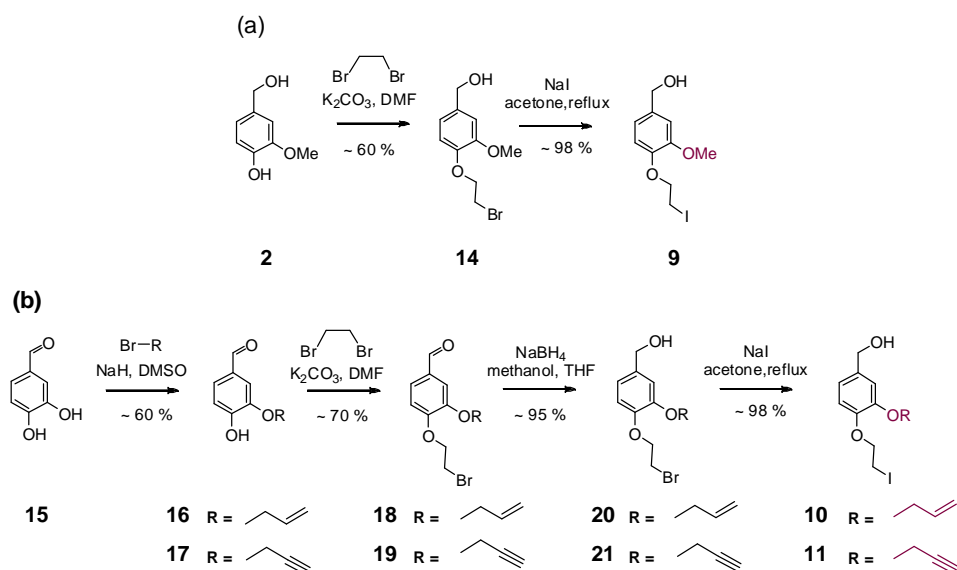


Figure 44 : (a) synthèse du monomère **9** (b) synthèse des monomères **10** et **11**

Les cryptophanes **5** et **6** sont finalement synthétisés en 12 étapes non linéaires avec des rendements respectifs de 1,2 et 2,9 %.

On accède aux cryptophanes **7** et **8** à partir du cryptophane **5** par déprotection de la fonction allyle (**7**) puis par alkylation avec le bromoacétate de méthyle et saponification (**8**) (Figure 45). Ils sont obtenus en 13 et 15 étapes avec des rendements d'environ 1 et 0,5 %.

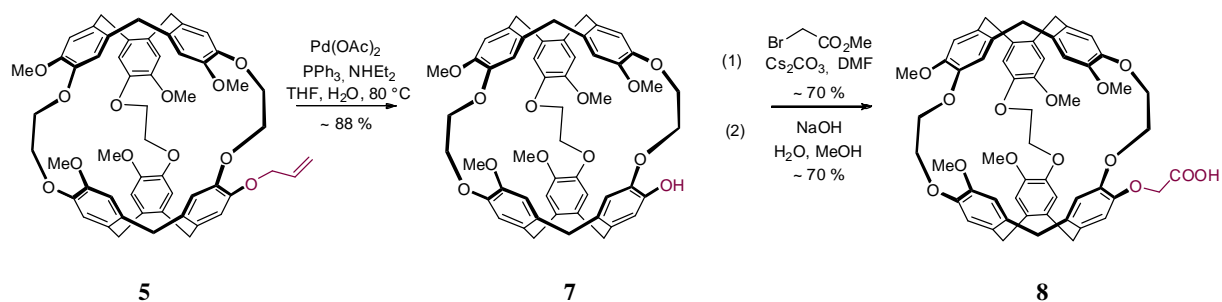


Figure 45 : synthèse des cryptophanes **7** et **8**

Le séparation des énantiomères du cryptophane **7** a été effectuée par l'équipe de Dutasta et Brotin<sup>70</sup> et sera détaillée en partie III.B.3.d).

<sup>70</sup> T. Brotin, R. Darbe, M. Darzac, J.-P. Dutasta, *Chem. Eur. J.*, **2003**, 9, 5784

Ces cryptophanes ont été synthétisés par Dmochowski en 2007 (Figure 46)<sup>71,72,73</sup>.

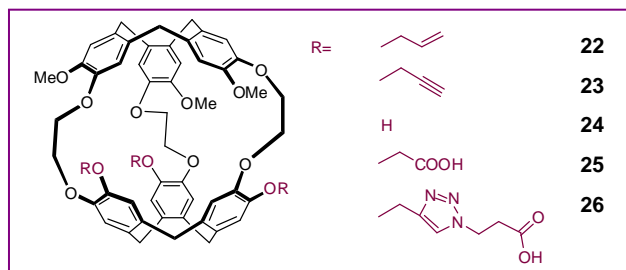


Figure 46 : cryptophanes tri-fonctionnalisés

Ils peuvent être obtenus selon deux voies de synthèse.

Dans la première voie, on introduit les monomères **10** ou **11** sur le CTV **1** (Figure 47). Puis une réaction de cyclotrimérisation donne accès aux cryptophanes **22** et **23** en 9 étapes non linéaires avec un rendement de 4,8 %<sup>71, 72</sup>.

## Voje 1

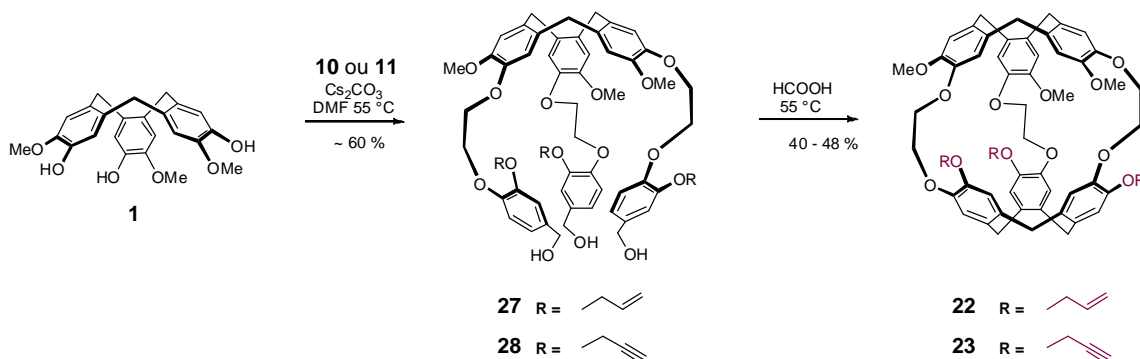


Figure 47 : voie 1, synthèse des cryptophanes 22 et 23

Dans la seconde voie décrite en 2011 par l'équipe de Dmochowski (Figure 48)<sup>73</sup> le monomère est cyclotrimérisé afin d'obtenir le CTV **29**. On introduit ensuite les monomères **16** ou **17**, puis on réduit les aldéhydes avant de cyclotrimériser pour obtenir les cryptophanes **22** et **23**. La deuxième voie est plus rapide que la première puisqu'elle réduit la synthèse à 6 étapes (au lieu de 9) avec des rendements meilleurs (9 % comparé à 4,8 %).

<sup>71</sup> P. A. Hill, Q. Wei, R. G. Eckenhoﬀ, I. J. Dmochowski, *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, *129*, 9262

<sup>72</sup> P. A. Hill, Q. Wei, T. Troxler, I. J. Dmochowski, *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, *131*, 3069

<sup>73</sup> O. Taratula, P. A. Hill, Y. Bai, N. S. Khan, I. J. Dmochowski, *Org. Lett.*, **2011**, *13*, 1414.

## Voie 2

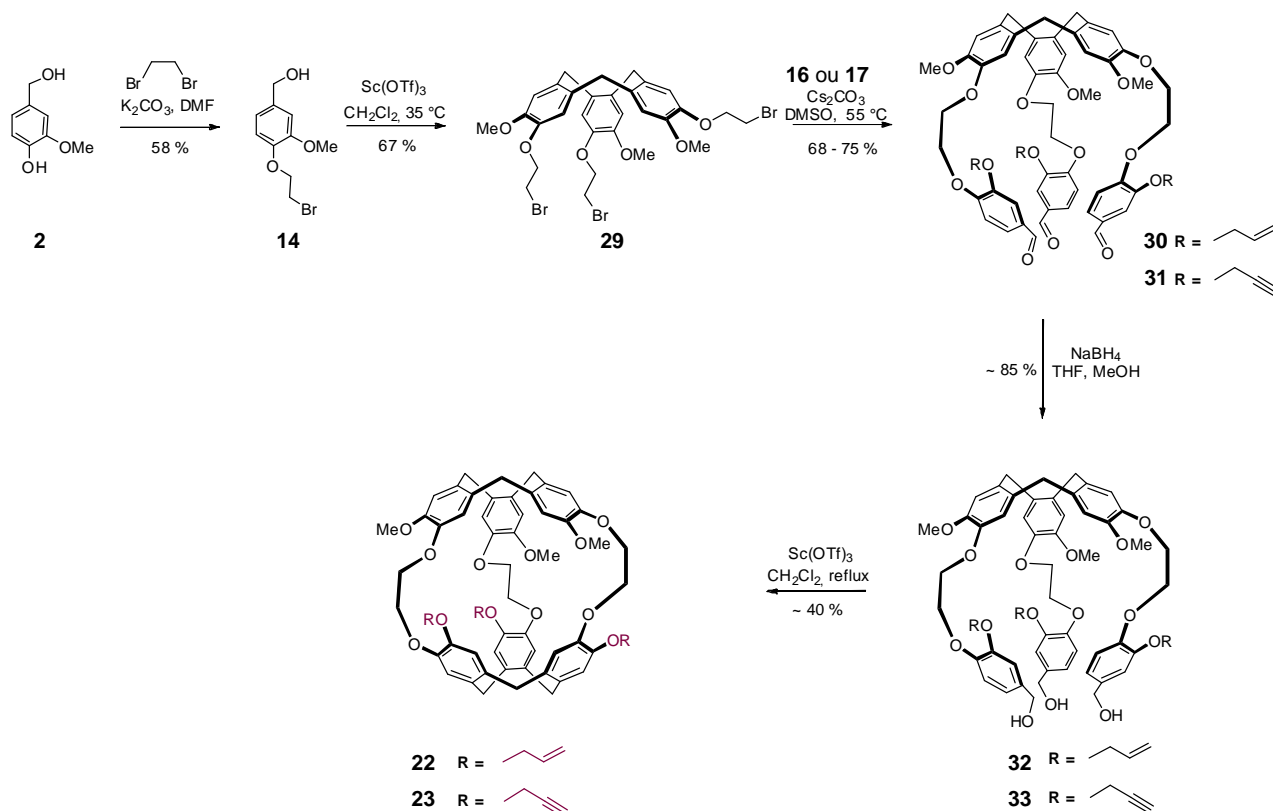


Figure 48 : voie 2, synthèse des cryptophanes **22** et **23**

Trois autres cryptophanes ont été obtenus à partir des cryptophanes **22** et **23** (Figure 49). La déallylation de **22** conduit au cryptophane **24**. L'alkylation de **24** par du bromoacétate de méthyle suivi d'une saponification mène au cryptophane **25**. Enfin, trois réactions de cycloaddition d'azotures sur les alcynes de **23** permettent d'accéder au cryptophane **26**. Ces trois derniers cryptophanes ont une meilleure solubilité en milieu aqueux et sont plus adaptés à la synthèse de biosondes.

Le dédoublement des deux énantiomères du cryptophane **24** a été décrit récemment<sup>74</sup>. Ces derniers permettent d'accéder aux cryptophanes **22**, **23** ou **25** énantiopurs.

<sup>74</sup> O. Taratula, M. P. Kim, Y. Bai, J. P. Philbin, B. A. Riggle, D. N. Haase, I. J. Dmochowski, *Org. Lett.*, **2012**, doi:10.1021/ol300943w

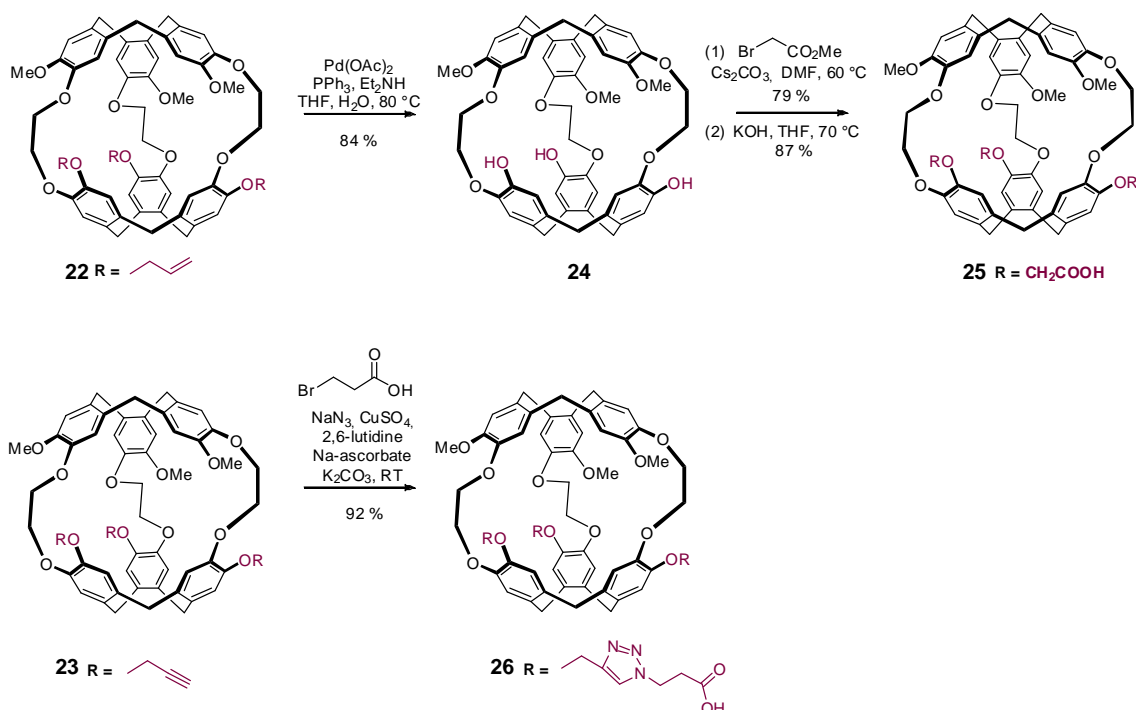


Figure 49 : synthèse de nouveaux cryptophanes tri-fonctionnalisés à partir de **22** et **23**

#### 🧪 Cryptophanes hexa-fonctionnalisés, précurseurs de biosonde

Ces cryptophanes décrits pour la première fois par l'équipe de Collet en 1987 sont aussi les premiers cryptophanes hydrosolubles (Figure 50)<sup>75</sup>.

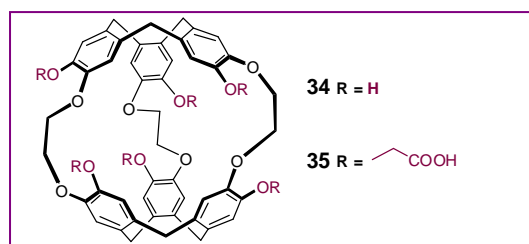


Figure 50 : cryptophanes hexa-fonctionnalisés

Les cryptophanes **34** et **35** (appelé aussi cryptophane-A3) sont respectivement obtenus en 8 et 10 étapes non linéaires avec des rendements d'environ 2,9 % et 1,4 % (Figure 51). Le CTV **1** est alkylé avec le monomère **9**. Puis le composé est cyclotrimérisé pour obtenir le cryptophane-A. Ce dernier peut être déméthylé en présence de  $\text{PPh}_2\text{Li}$ , puis alkylé par du bromoacétate de méthyle et saponifié.

<sup>75</sup> J. Canceill, L. Lacombe, A. Collet, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1987**, 219



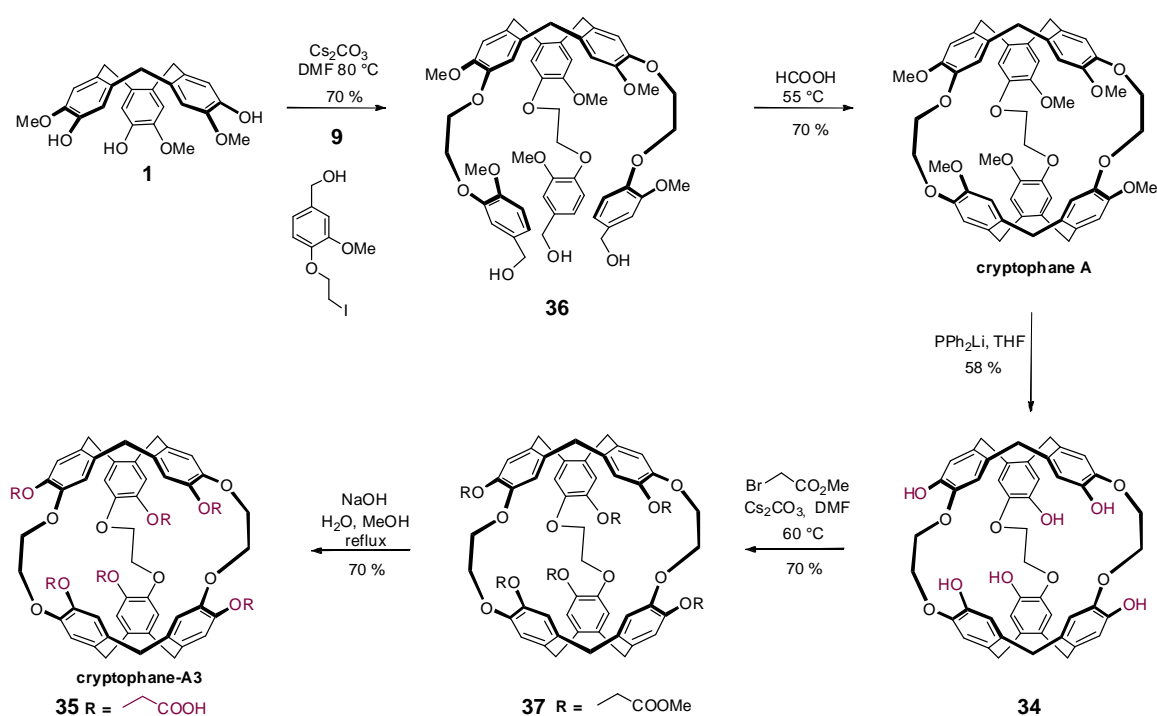


Figure 51 : schéma réactionnel de synthèse des cryptophanes hexa-fonctionnalisés

Le composé **35**, par la présence de six fonctions acide carboxylique ( $\text{CH}_2\text{COOH}$ ) est déjà une biosonde sensible au pH dont nous détaillerons les propriétés par la suite. La nature des contre-ions ( $\text{Li}^+$ ,  $\text{Na}^+$  ou  $\text{K}^+$ ) des fonctions phénates du composé **34** influence fortement les propriétés d'encapsulation du xénon<sup>76</sup>. En présence de  $\text{Cs}^+$ , le xénon ne rentre plus dans la cage car le cryptophane encapsule le cation avec une bien plus haute affinité<sup>77</sup>.

## ii- Synthèse et fonctionnalisation de cryptophane-111

Le cryptophane-111 peut être obtenu par trois voies différentes.

La première est la synthèse originelle<sup>64,78</sup> à partir du CTV **1** en 4 étapes (Figure 52). On forme les triflates à partir des phénols pour les cliver en présence de palladium puis on déméthyle le CTV **39**. Finalement un couplage avec un excès de chlorobromométhane donne le cryptophane-111 avec un rendement de 11%. La synthèse a un rendement global de 1,5 % pour 7 étapes linéaires.

<sup>76</sup> P. Berthault, H. Desvaux, T. Wendlinger, M. Gyejacquot, A. Stopin, T. Brotin, J.-P. Dutasta, Y. Boulard, *Chem. Eur. J.*, **2010**, 16, 12941

<sup>77</sup> T. Brotin, R. Montserret, A. bouchet, D. Cavagnat, M. Linares, T. Buffeteau, *J. Org. Chem.*, **2012**, 77, 1198

<sup>78</sup> T. Brotin, V. Roy, J.-P. Dutasta, *J. Org. Chem.*, **2005**, 70, 6187

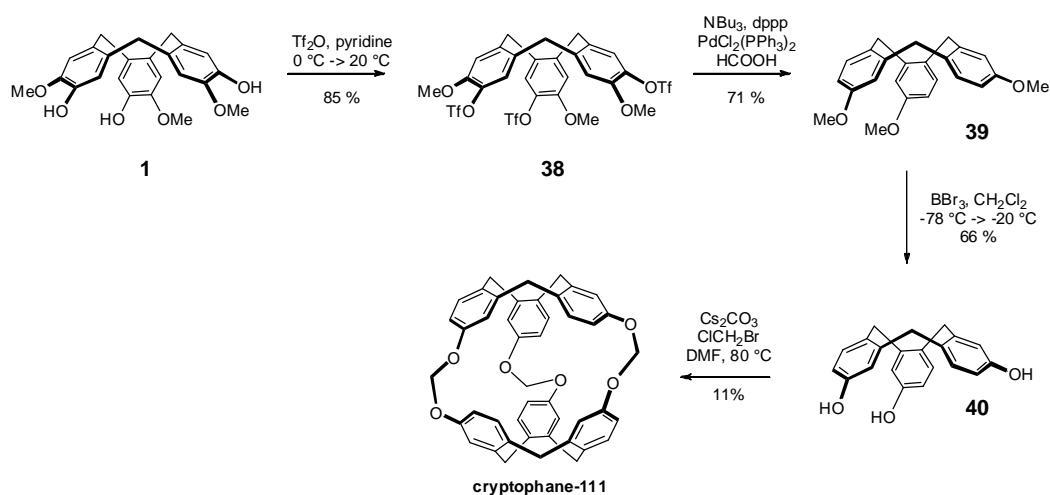


Figure 52 : première synthèse du cryptophane-111

La deuxième voie de synthèse permet d'obtenir le composé en cinq étapes avec un rendement global de 12 %<sup>79</sup> (Figure 53). Le produit commercial **41** est protégé par un benzyle, puis cyclotrimérisé en CTV **43**. Deux étapes de déprotection sont ensuite nécessaires avant d'engager le CTV **40** dans un couplage final dans des conditions optimisées avec un rendement de 46 % (au lieu de 11 %). Cette voie a cependant le défaut de nécessiter un produit de départ coûteux.

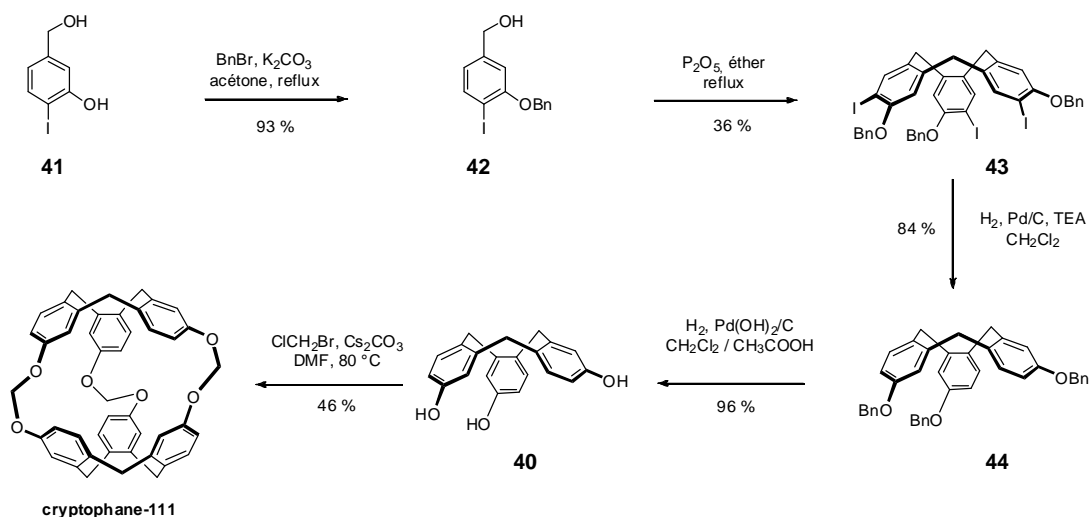


Figure 53 : synthèse améliorée du cryptophane-111

<sup>79</sup> T. Traoré, L. Delacour, S. Garcia-Argote, P. Berthault, J.-C. Cintrat, B. Rousseau, *Org. Lett.*, **2010**, *12*, 960

1. *Journal of the American Medical Association*, 1997; 278: 1039-1044.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80 81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100

Les composés obtenus ont été fonctionnalisés avec succès par réaction de lithiation<sup>81,82</sup> ou de couplage au palladium<sup>83</sup>. Ces biosondes ont fait l'objet des thèses des Docteurs Ténin Traoré et Léa Delacour.

Une autre forme de fonctionnalisation adoptée par Holman<sup>37</sup> est la complexation de cations métalliques sur les cycles aromatiques (Figure 56). Le groupe a réussi à introduire six cations de manière stable afin de rendre le cryptophane-111 hydrosoluble.

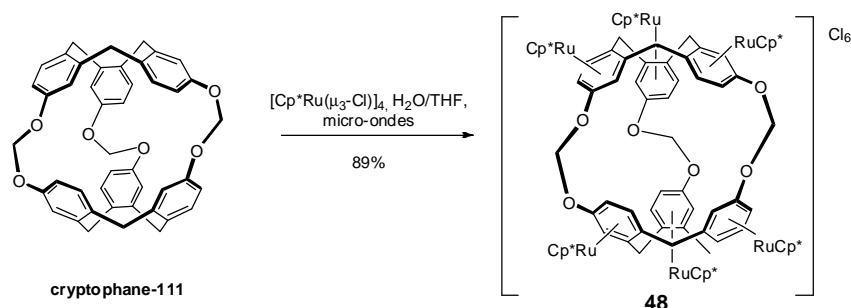


Figure 56 : fonctionnalisation du cryptophane-111 par complexation métallique

### e) Propriétés d'encapsulation des cryptophanes

Dès 1985, les cryptophanes sont décrits par l'équipe de Collet pour encapsuler des petites molécules neutres telles que le bromochlorofluorométhane<sup>84</sup>, le chloroforme<sup>85, 86</sup> ou le dichlorométhane<sup>87,88</sup>. Par la suite, les phénomènes de complexation de l'acétylcholine avec le cryptophane-O hydrosoluble<sup>89</sup> et l'encapsulation du méthane dans le cryptophane-A<sup>90</sup> sont étudiés. C'est en 1998 que le groupe publie ses travaux sur l'encapsulation du xénon dans le cryptophane-A observé par RMN  $^{129}\text{Xe}$  et  $^1\text{H}$ <sup>91</sup>. Outre les applications en IRM  $^{129}\text{Xe}$ , les

<sup>81</sup> T. Traoré, Thèse de doctorat en chimie organique de l'Université Paris Sud

<sup>82</sup> T. Traoré, G. Clavé, L. Delacour, N. Kotera, P.-Y. Renard, A. Romieu, P. Berthault, C. Boutin, N. Tassali, B. Rousseau, *Chem. Commun.*, **2011**, 47, 9702

<sup>83</sup> L. Delacour, Thèse de doctorat en chimie organique de l'Université Paris Sud

<sup>84</sup> J. Canceill, L. Lacombe, A. Collet, *J. Am. Chem. Soc.*, **1985**, 107, 6993

<sup>85</sup> J. Canceill, M. Cesario, A. Collet, J. Guilhem, L. Lacombe, B. Lozach, C. Pascard, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1989**, 28, 1246

<sup>86</sup> J. Canceill, L. Lacombe, A. Collet, *J. Am. Chem. Soc.*, **1986**, 108, 4230

<sup>87</sup> J. Canceill, M. Cesario, A. Collet, J. Guilhem, C. Pascard, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1985**, 361

<sup>88</sup> J. Canceill, M. Cesario, A. Collet, J. Guilhem, C. Riche, C. Pascard, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1986**, 339

<sup>89</sup> L. Garel, B. Lozach, J.-P. Dutasta, A. Collet, *J. Am. Chem. Soc.*, **1993**, 115, 11652

<sup>90</sup> L. Garel, J.-P. Dutasta, A. Collet, *Angew. Chem.*, **1993**, 32, 1169

<sup>91</sup> K. Bartik, M. Luhmer, J.-P. Dutasta, A. Collet, J. Reisse, *J. Am. Chem. Soc.*, **1998**, 120, 784

cryptophanes restent aujourd'hui des molécules intéressantes pour la reconnaissance de petites molécules chirales<sup>92,93</sup> ou la détection d'autres gaz<sup>94,95,65</sup>.

### *i- Effet d' "induced fit"*

Les cryptophanes sont capables de s'adapter à leurs hôtes. C'est ce qu'a démontré l'équipe de Dmochowski en s'intéressant à l'évolution du volume d'une même cage contenant différentes molécules (Tableau 4)<sup>96</sup>. L'équipe a réussi à isoler des cristaux de dérivés de cryptophane-A contenant différentes molécules (de l'eau, du chloroforme, du méthanol ou du xénon) et a déterminé à partir des structures cristallines la taille des cavités internes. Le cryptophane triallyle **22** (Figure 46), a un volume de 84 Å<sup>3</sup> lorsqu'il encapsule du méthanol, alors qu'avec du chloroforme, cette même molécule a une cavité interne comprise entre 98 et 102 Å<sup>3</sup> selon la conformation du cryptophane (deux conformations différentes ont été identifiées au sein des cristaux obtenus). Il semblerait que cette augmentation du volume d'environ 20 % soit rendue possible grâce à la flexibilité des bras espaceurs éthylènedioxy qui présentent une conformation gauche ou anti selon l'invité encapsulé. Ce changement de taille de la molécule cage est motivé par des forces de London favorables.

Invité	Hôte	Volume de l'hôte (Å <sup>3</sup> )	Volume de l'invité (Å <sup>3</sup> )	Rapport des volumes invité/hôte
Méthanol	<b>22</b>	84	33	0,39
Xénon	<b>22</b> (conformation 1) <sup>a</sup>	89	42	0,47
Xénon	<b>22</b> (conformation 2) <sup>a</sup>	87	42	0,48
Chloroforme	<b>22</b> (conformation 1) <sup>a</sup>	102	72	0,71
Chloroforme	<b>22</b> (conformation 2) <sup>a</sup>	98	72	0,73

Tableau 4 : Volumes internes et ratio entre volumes hôte/invité selon les différentes molécules encapsulées (a) deux conformations différentes ont été identifiées au sein des cristaux

<sup>92</sup> A. Bouchet, T. Brotin, M. Linares, H. Agren, D. Cavagnat, T. Buffeteau, *J. Org. Chem.*, **2011**, 76, 4178

<sup>93</sup> A. Bouchet, T. Brotin, M. Linares, D. Cavagnat, T. Buffeteau, *J. Org. Chem.*, **2011**, 76, 7816

<sup>94</sup> D. R. Jacobson, N. S. Khan, R. Collé, R. Fitzgerald, L. Laureano-Pérez, Y. Baia, I. J. Dmochowski, *PNAS*, **2011**, 108, 10969

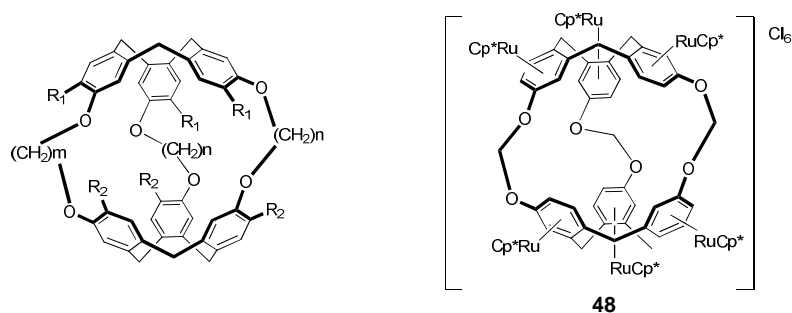
<sup>95</sup> C. Tao, X. Li, J. Yang, Y. Shi, *Sensors and Actuators B*, **2011**, 156, 553

<sup>96</sup> O. Taratula, P. A. Hill, N. S. Khan, P. J. Carroll, I. J. Dmochowski, *Nat. Commun.*, **2010**, 1, 148

## ii- Propriétés d'encapsulation du xénon

### Constante d'affinité

Le ratio entre le volume du xénon et le volume de la cavité se rapproche le plus du ratio optimal prédit par Rebek pour le cryptophane-111 (Tableau 5). Ce cryptophane possède bien la meilleure affinité, que ce soit en milieu organique ( $10000 \text{ M}^{-1}$  à 293 K dans le tétrachloroéthane) ou dans sa version hydrosoluble ( $29000 \text{ M}^{-1}$  à 293 K dans l'eau).



Entrée	n, m	R <sub>1</sub> = R <sub>2</sub>	Volume de la cavité (Å <sup>3</sup> )	V(Xe)/V(crypto)	K(M <sup>-1</sup> )
1	1,1	H	81	0,52	10000 <sup>ab</sup>
2	2,2	OCH <sub>3</sub>	95	0,44	3000 <sup>a</sup>
3	2,3	OCH <sub>3</sub>	102	0,41	2800 <sup>a</sup>
4	2,4	OCH <sub>3</sub>	110	0,38	9,5 <sup>a</sup>
5	3,2	OCH <sub>3</sub>	117	0,36	810 <sup>a</sup>
6	3,3	OCH <sub>3</sub>	121	0,35	5-10 <sup>a</sup>
7	1,1	H + 6[Cp* <sup>+</sup> Ru]	81	0,52	29000 <sup>b</sup>
8	2,2	OCH <sub>2</sub> COOH	95	0,44	6800 <sup>b</sup>
9	2,3	OCH <sub>2</sub> COOH	102	0,41	2200 <sup>b</sup>
10	3,2	OCH <sub>2</sub> COOH	117	0,36	2200 <sup>b</sup>
11	3,3	OCH <sub>2</sub> COOH	121	0,35	1000 <sup>b</sup>

Tableau 5 : constantes d'affinité de différents cryptophanes pour le xénon et volume interne de la cavité estimé à partir de GRASP<sup>97</sup>. (ab) mesurées à 293 K dans C<sub>2</sub>D<sub>2</sub>Cl<sub>4</sub>. (a) mesurées à 278 K dans 1,1,2,2-tétrachloroéthane-d<sub>2</sub> (C<sub>2</sub>D<sub>2</sub>Cl<sub>4</sub>). (b) mesurées à 293 K dans D<sub>2</sub>O<sup>17</sup>

Les constantes d'affinités sont logiquement décroissantes avec des valeurs croissantes de volume de cages<sup>98,99,100</sup>, excepté pour le cryptophane-224 qui a une constante plus petite que le

<sup>97</sup> A. Nicholls, B. Sharp, B. Honig, *Proteins*, **1991**, 11, 281

<sup>98</sup> T. Brotin, J.-P. Dutasta, *Eur. J. Org. Chem.*, **2003**, 973

cryptophane-233 alors qu'il a une cavité plus petite. Ce phénomène peut s'expliquer par la grande flexibilité du pont butanedioxy. De plus, pour ces grandes cages, le solvant peut entrer en compétition avec le xénon et réduire la constante d'affinité.

Pour un même volume de cavité, les constantes d'affinités sont plus grandes dans l'eau (entrées 7 à 11) que dans des solvants organiques (entrées 1 à 6). En effet, le xénon étant peu soluble en milieu aqueux, il préfère l'environnement hydrophobe de la cavité des cryptophanes.

### Vitesse d'échange

La vitesse d'échange est directement corrélée à la largeur du pic à mi-hauteur du xénon encapsulé. Plus le pic est large, plus la vitesse d'échange est grande.

Jusqu'à présent, tous les cryptophanes étudiés montrent un échange lent à l'échelle de la RMN. La différence de déplacement chimique entre le xénon encapsulé et libre est supérieure à 112 ppm (Tableau 6).

De manière générale, la vitesse d'échange augmente avec la taille de la cage. À titre d'exemple, le cryptophane-111 présente une vitesse d'échange de 2,4 Hz<sup>64</sup> alors que le cryptophane-A a une vitesse d'échange supérieure d'environ deux ordres de grandeur<sup>91</sup>. Une vitesse élevée d'entrée et de sortie du xénon est nécessaire à l'apport continu de gaz hyperpolarisé.

Cryptophane	n,m	R <sub>1</sub> = R <sub>2</sub>	Solvant	δ <sub>Xe</sub> encapsulé (ppm)	δ <sub>Xe</sub> libre - δ <sub>Xe</sub> encapsulé  (ppm)
-111	1,1	H	C <sub>2</sub> D <sub>2</sub> Cl <sub>4</sub>	31	193
<b>48</b>	<b>1,1</b>	<b>H +6[Cp*Ru]</b>	<b>D<sub>2</sub>O</b>	<b>308</b>	<b>112</b>
-A	2,2	OCH <sub>3</sub>	C <sub>2</sub> D <sub>2</sub> Cl <sub>4</sub>	63	161
<b>-A3</b>	<b>2,2</b>	<b>OCH<sub>2</sub>COOH</b>	<b>D<sub>2</sub>O</b>	<b>64</b>	<b>132</b>
-E	3,3	OCH <sub>3</sub>	C <sub>2</sub> D <sub>2</sub> Cl <sub>4</sub>	30	194
<b>-E3</b>	<b>3,3</b>	<b>OCH<sub>2</sub>COOH</b>	<b>D<sub>2</sub>O</b>	<b>35</b>	<b>161</b>

Tableau 6 : déplacements chimiques du xénon encapsulé quelques cryptophanes d'intérêt à 293 K<sup>99,91,64,37,101</sup>

<sup>99</sup> G. Huber, L. Beguin, H. Desvaux, T. Brotin, H. Fogarty, J.-P. Dutasta, P. Berthault, *J. Phys. Chem. A*, **2008**, *112*, 11363

<sup>100</sup> H. Desvaux, G. Huber, T. Brotin, J.-P. Dutasta, P. Berthault, *Chem. Phys. Chem.*, **2003**, *4*, 384

<sup>101</sup> A. Bagno, G. Saielli, *Chem. Eur. J.*, **2012**, *18*, 7341

## Vitesse de relaxation

La relaxation longitudinale  $T_1$  du xénon est définie dans l'Équation 2 avec  $x_{\text{caged}}$  la fraction de xénon encapsulé,  $T_1^{\text{caged}}$  le temps de relaxation du xénon dans la cage et  $T_1^{\text{free}}$  le temps de relaxation du xénon libre.

$$\frac{1}{T_1} = \frac{1}{T_1^{\text{caged}}} \cdot x_{\text{caged}} + \frac{1}{T_1^{\text{free}}} \cdot (1 - x_{\text{caged}})$$

Équation 2

$T_1^{\text{free}}$  étant très long (de l'ordre de quelques minutes), on considère que  $T_1^{\text{caged}}$  est directement proportionnel à  $T_1$  (obtenu expérimentalement) (Équation 3).

$$\frac{1}{T_1} = \frac{1}{T_1^{\text{caged}}} \cdot x_{\text{caged}}$$

Équation 3

Afin de conserver le xénon à l'état d'hyperpolarisation, il est très important de travailler avec des  $T_1^{\text{caged}}$  les plus longs possible.

Entrée	Cryptophane	n,m	$R_1 = R_2$	Solvant	$T_1^{\text{caged}}$ (s)
1	-111	1,1	H	$\text{C}_2\text{D}_2\text{Cl}_4$	12,1
2	-222	2,2	H	$\text{C}_2\text{D}_2\text{Cl}_4$	3,9 <sup>a</sup>
3	-A	2,2	$\text{OCH}_3$	$\text{C}_2\text{D}_2\text{Cl}_4$	18,8

Tableau 7 : temps de relaxation longitudinale du xénon encapsulé dans différents hôtes à 293 K et 11,7 T (a) valeur de 16 s à 295 K et 9,4 T

Sur les quelques exemples présentés dans le Tableau 7, on peut voir que deux paramètres jouent sur le temps de relaxation ; la nature des substituants sur les cycles aromatiques, et la longueur des ponts entre les deux unités CTV. En effet, pour les cryptophanes-111 et -222 qui ne diffèrent que par la longueur des chaînes pontantes, on constate que le temps de relaxation est plus long pour le cryptophane-111 (entrées 1 et 2). Il semblerait que les protons des ponts contribuent à une relaxation plus rapide, par leur nombre et leur positionnement. Sur le



cryptophane-111, il n'y a que deux protons par pont, et ils sont dirigés vers l'extérieur de la cavité. Cela limite les interactions avec le xénon, donc sa relaxation. D'autre part, la présence de protons aromatiques semble contribuer à la relaxation plus rapide du xénon lorsque l'on compare notamment les cryptophanes –A et -222 (entrées 2 et 3).

Le cryptophane idéal en termes de relaxation du xénon doit donc avoir le minimum de protons sur les ponts reliant les deux unités CTV et posséder des substituants avec le moins d'atomes d'hydrogène possible sur les aromatiques.

En conclusion, si l'on tient compte des trois paramètres présentés ici, les cages les plus adaptées pour des applications en IRM  $^{129}\text{Xe}$  sont les cryptophanes -111 et –A en milieu organique et les cryptophanes **48** et **35** en milieu aqueux (Figure 57).

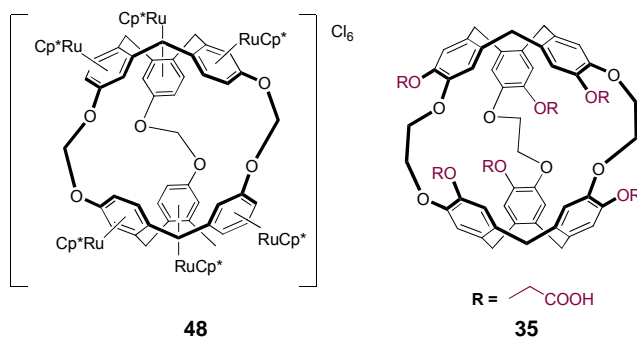


Figure 57 : les meilleurs candidats en milieu aqueux

## f) Les cryptophanes-biosondes par équipes

### i- Equipe de Pines et Wemmer

#### Biotine-avidine

L'équipe de Pines et Wemmer est la première à synthétiser une biosonde utilisant la RMN  $^{129}\text{Xe}$  en 2001. L'idée est de greffer une biotine sur le cryptophane afin de détecter la streptavidine par formation d'un complexe stable. La streptavidine est une protéine tétramère de 52 800 Da purifiée à partir de la bactérie *Streptomyces avidinii*. Sa forte affinité avec la biotine (constante de dissociation de l'ordre de  $\sim 1 \times 10^{-15}$  mol/L) est une des interactions non-covalentes les plus fortes connues dans la nature.

Cette biosonde se compose d'un cryptophane hydrophobe (noir), d'un bras espaceur hydrosoluble (vert) et d'une antenne de reconnaissance, la biotine (bleu) (Figure 58). Lorsque le complexe biotine / avidine se forme, les contraintes imposées au cryptophane modifient l'environnement chimique du gaz encapsulé et conduit à un déplacement chimique différent du xénon. Le xénon a une sensibilité telle aux perturbations électroniques de son milieu qu'une deutération d'un groupement méthyle de la molécule hôte suffit pour avoir une signature spectrale du xénon différente<sup>102</sup>.

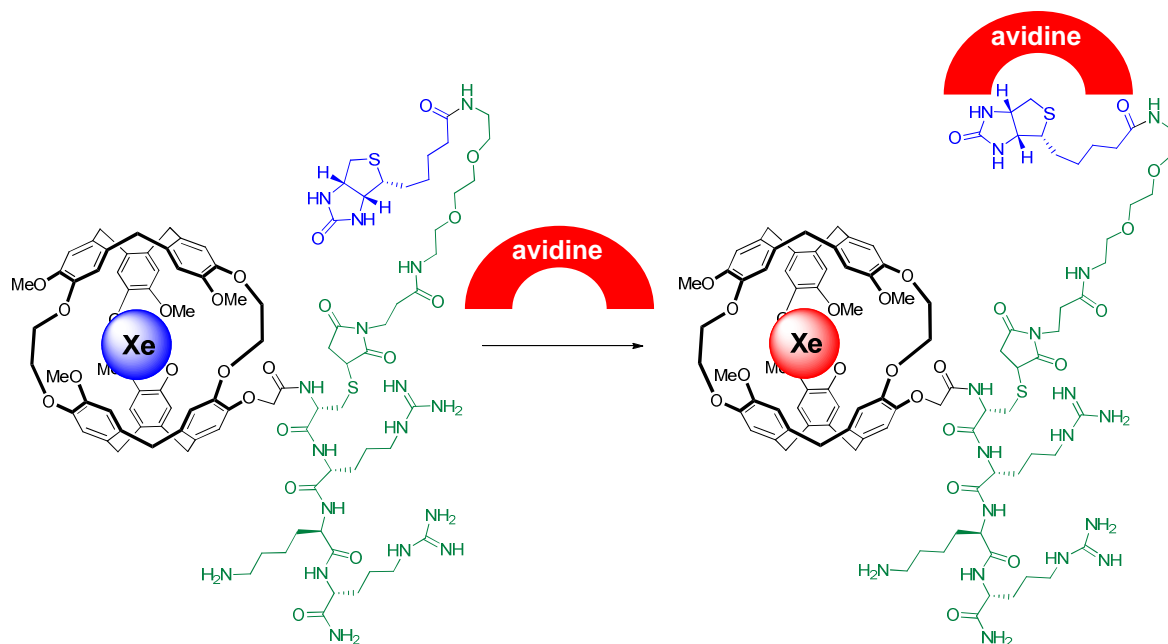


Figure 58 : biosonde pour la détection du complexe biotine / avidine

<sup>102</sup> T. Brotin, A. Lesage, L. Emsley, A. Collet, *J. Am. Chem. Soc.*, **2000**, 122, 1171

La biosonde est synthétisée en dix-sept étapes non linéaires, sans compter les étapes de synthèse du bras peptidique hydrosoluble **49** et du dérivé de biotine **51**, avec un rendement inférieur à 0,5 % (Figure 59). Le bras hydrosoluble constitué d'un enchaînement d'acides aminés (cystéine, arginine et lysine) **49** est introduit sur le cryptophane **8** afin de rendre la sonde partiellement hydrosoluble. Finalement, une réaction de couplage entre la fonction thiol de **50** avec le groupement maléimide du dérivé de biotine **51** donne accès à la biosonde **52**<sup>103</sup>.

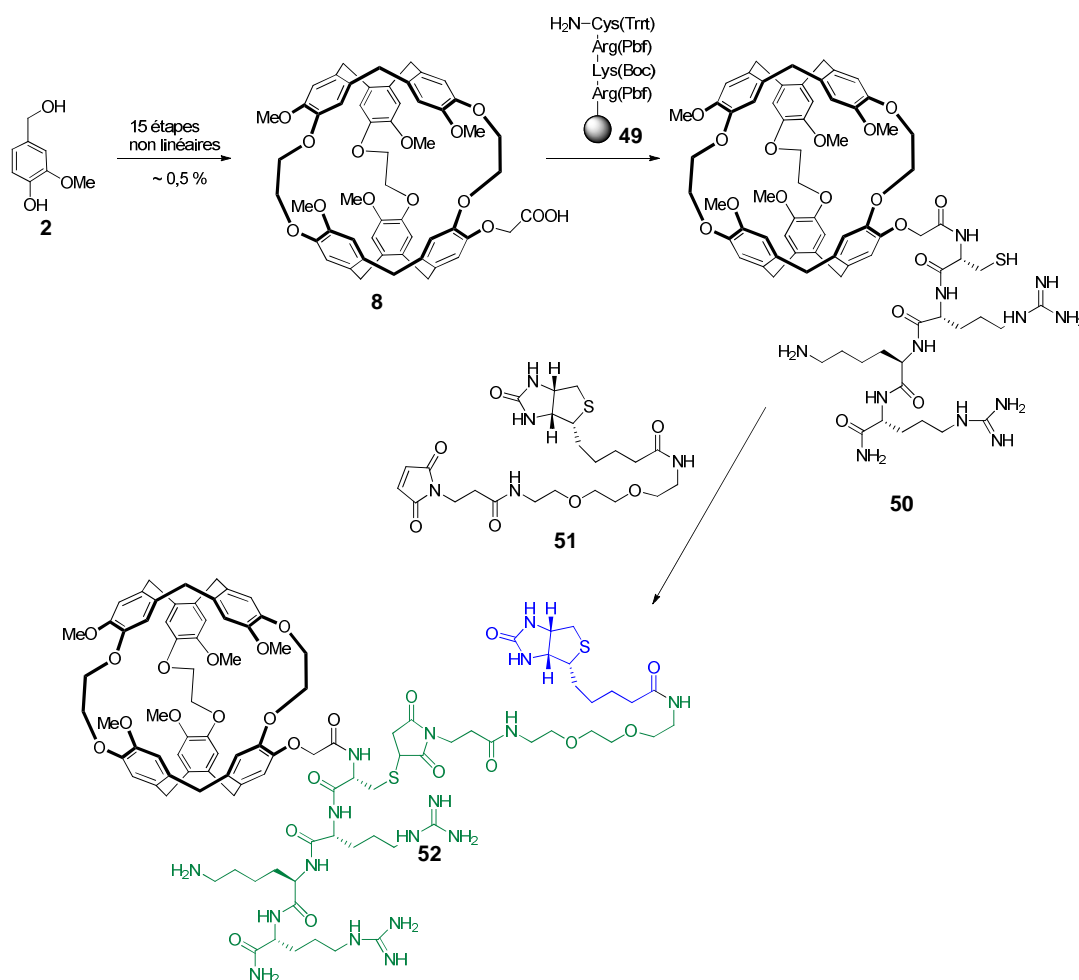


Figure 59 : schéma de synthèse de la biosonde biotine/avidine

Le cryptophane **8** est chiral et la RMN du xénon encapsulé dans le mélange racémique montre un seul pic (Figure 60a). La première paire de diastéréoisomères apparaît avec l'introduction de la chaîne de L-acides aminés chiraux. Le spectre RMN xénon de **50** montre alors deux pics

<sup>103</sup> M. M. Spence, E. J. Ruiz, S. M. Rubin, T. J. Lowery, N. Winssinger, P. G. Schultz, D. E. Wemmer, A. Pines, *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, 126, 15287

séparés de 0,15 ppm correspondant aux deux diastéréoisomères (+)L et (-)L (Figure 60b). Lorsque l'on couple cet intermédiaire à la biotine **51**, on génère quatre composés chiraux (+)LR, (+)LS, (-)LR, (-)LS qui donnent quatre pics distincts sur le spectre RMN  $^{129}\text{Xe}$  (Figure 60c). La complexation de la biotine avec l'avidine conduit à l'apparition d'une nouvelle résonance à 74 ppm (Figure 60d et e).

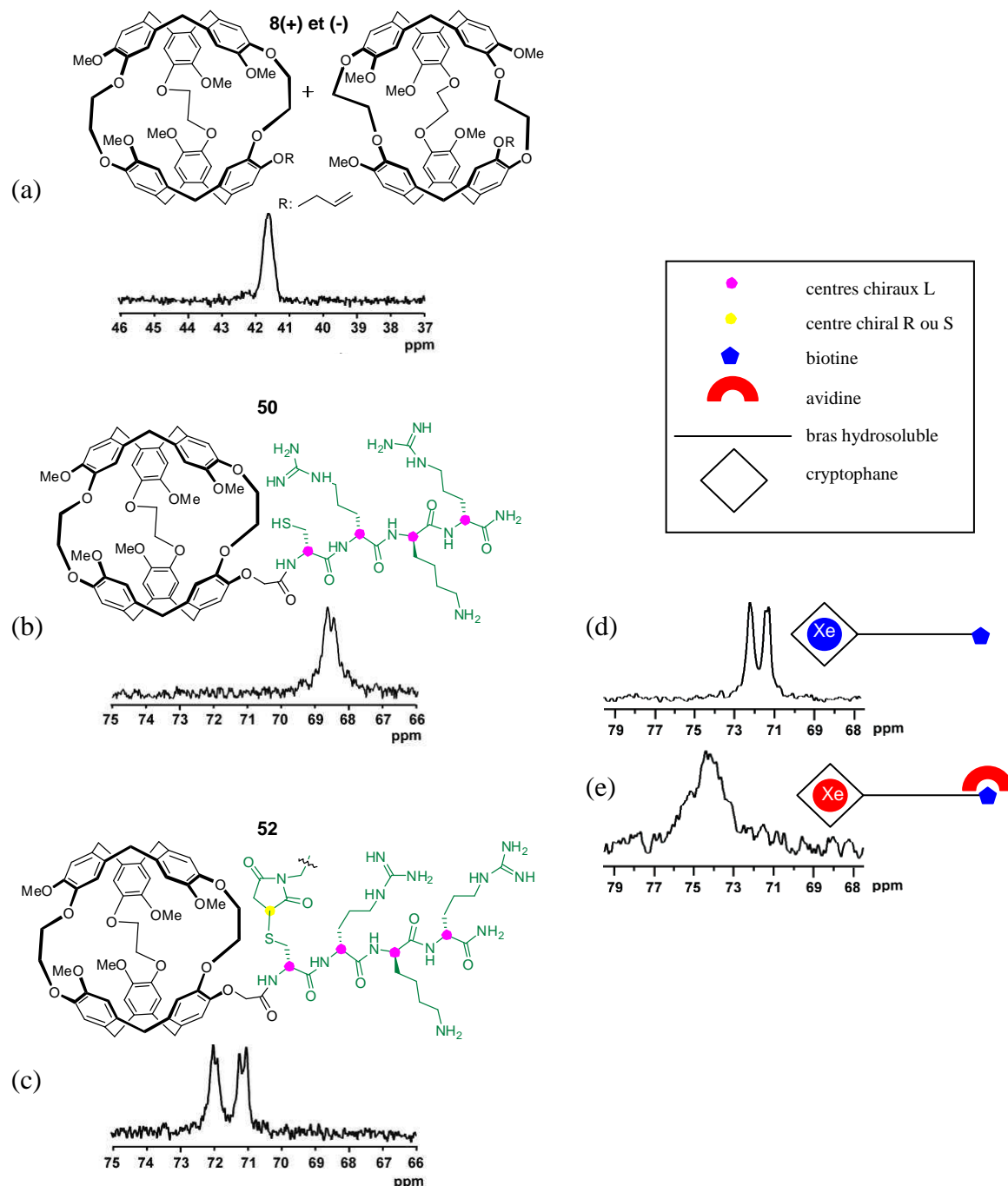


Figure 60 : spectres RMN  $^{129}\text{Xe}$  hyperpolarisé (a) **8** dans 25 % toluène / 75 % tétrachloréthane, (b) **50** dans  $\text{D}_2\text{O}$ , (c) et (d) **52** sans avidine dans  $\text{D}_2\text{O}$  et (e) **52** avec avidine dans  $\text{D}_2\text{O}$ . Tous les cryptophanes sont utilisés à des concentrations de l'ordre de 100  $\mu\text{M}$ .

L'avidine liée à la biosonde a été visualisée par IRM  $^{129}\text{Xe}$  quelques années plus tard par les mêmes auteurs<sup>104</sup>. L'équipe de Pines et Wemmer a conçu la biosonde **53** comportant un bras espaceur différent de celui décrit précédemment (Figure 61)<sup>105</sup>.

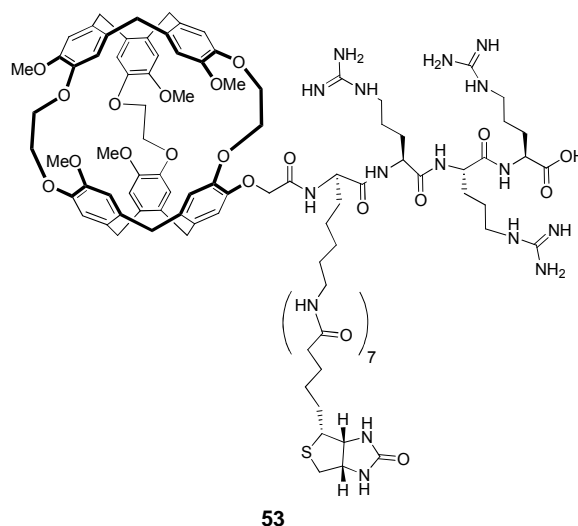


Figure 61 : biosonde **53** utilisée pour faire de l'imagerie IRM  $^{129}\text{Xe}$  du complexe biotine / avidine

Cette biosonde **53** est retenue sur lit d'avidine immobilisée sur un gel d'agarose par son interaction avec la protéine (Figure 62). Un flux continu d'eau saturée en xénon hyperpolarisé est ensuite envoyé sur l'échantillon solide (Figure 62a). La distribution spatiale de cette biosonde est ensuite visualisée (Figure 62b). La tache aux alentours de 200 ppm diffusant tout le long du tube correspond au xénon libre dissout dans l'agarose. La tache bleue localisée entre 0,2 et 1 cm selon l'axe  $z$  correspond au xénon encapsulé dans la sonde **53** complexée à l'avidine. Dans cet environnement, la fréquence de résonance du xénon est de 65,4 ppm. Cette image est en accord avec l'image optique du tube (Figure 62a) où la région bleue représente la zone où l'avidine est immobilisée.

<sup>104</sup> C. Hilty, T. J. Lowery, D. E. Wemmer, A. Pines, *Angew. Chem.*, **2006**, 118, 76

<sup>105</sup> T. J. Lowery, S. Garcia, L. Chavez, E. J. Ruiz, T. Wu, T. Brodin, J.-P. Dutasta, D. S. King, P. G. Schultz, A. Pines, D. E. Wemmer, *ChemBioChem*, **2006**, 7, 65

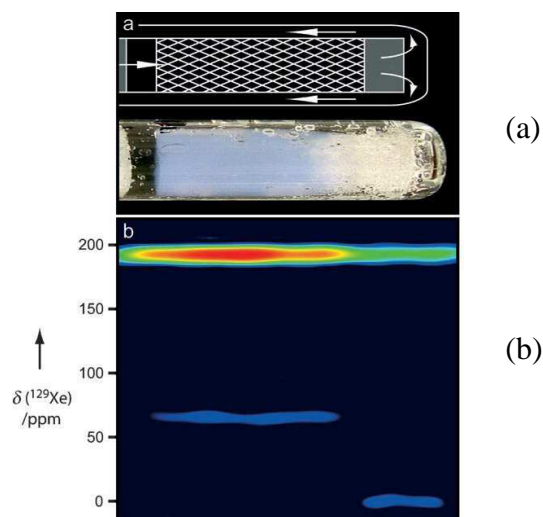


Figure 62 : (a) avidine immobilisée sur support solide, (b) image par RMN  $^{129}\text{Xe}$  hyperpolarisé de la distribution spatiale du complexe biosonde biotine / avidine

### 🚦 Biosonde de température

La même équipe a montré en 2010 qu'il était possible d'utiliser les cryptophanes comme des sondes en température<sup>106</sup>. La différence de déplacement chimique entre le xénon encapsulé au sein du cryptophane-A et le xénon libre évolue selon la température du milieu. Il existe en fait une corrélation linéaire qui permet de déterminer *in vitro* les températures à partir du déplacement chimique du xénon.

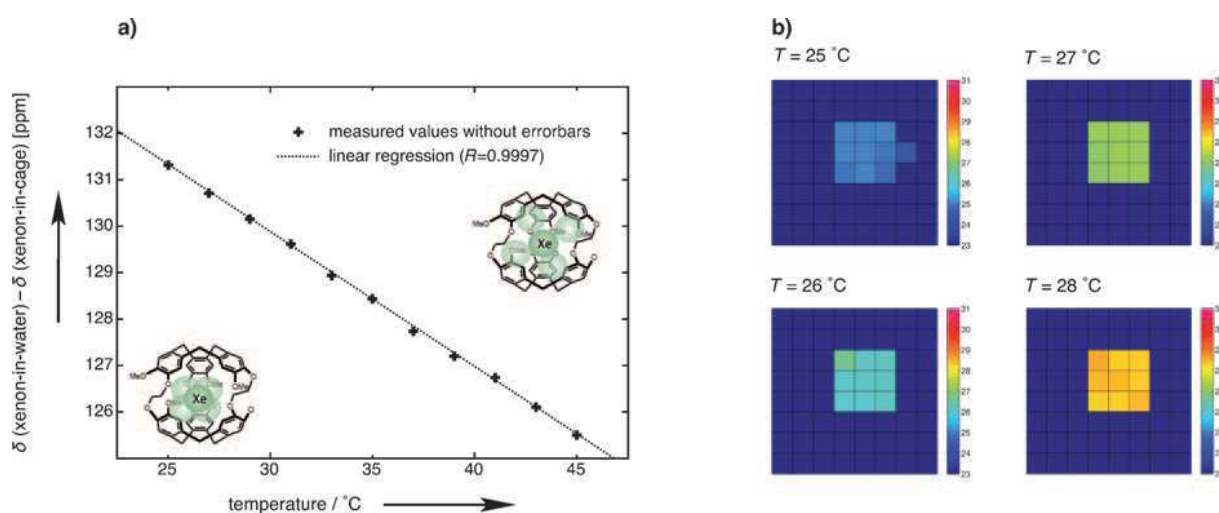


Figure 63 : (a) relation entre la température et la différence de déplacement chimique entre xénon encapsulé et xénon libre à 150  $\mu\text{M}$  (b) cartographie de température détectée au sein de tube RMN homogène en température

<sup>106</sup> F. Schilling, L. Schröder, K. K. Palaniappan, S. Zapf, D. E. Wemmer, A. Pines, *ChemPhysChem* **2010**, *11*, 3529

## ii- Équipe de Dutasta et Brotin avec l'équipe de Berthault

### 🚩 Biosonde à brin d'ADN

L'équipe de Dutasta et Brotin en collaboration avec l'équipe de Berthault a travaillé sur une biosonde constituée d'un cryptophane relié de manière covalente à un brin d'ADN<sup>66</sup>. La présence du brin d'ADN complémentaire en solution induit une variation du déplacement chimique du xénon encapsulé (Figure 64).

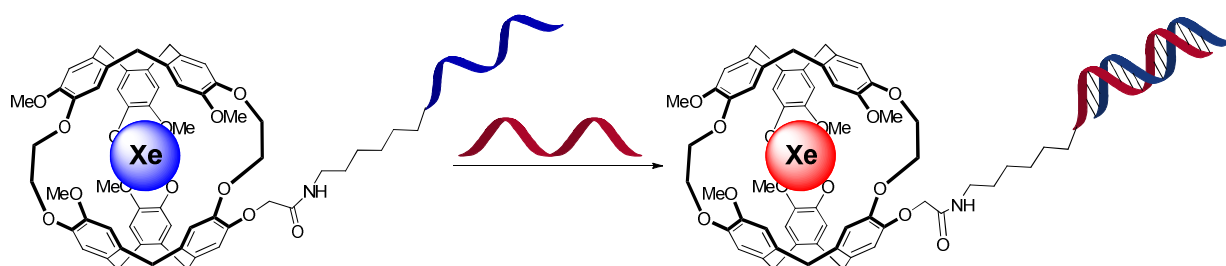


Figure 64 : biosonde à brin d'ADN

Cette biosonde est obtenue en dix-sept étapes non linéaires, sans tenir compte de la synthèse du brin d'ADN, avec un rendement inférieur à 0,5 %.

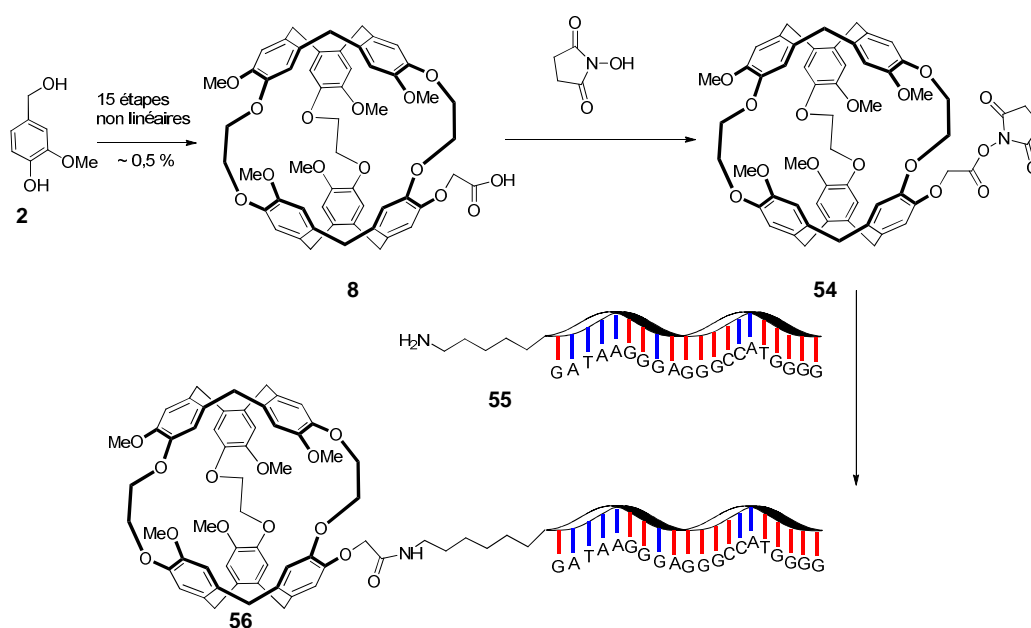


Figure 65 : schéma de synthèse de la biosonde brin d'ADN

Après l'activation du cryptophane **8** avec du *N*-hydroxysuccinimide (NHS) pour former **54**, un couplage peptidique avec le brin d'ADN **55** permet d'obtenir la biosonde finale **56** (Figure 65). Les spectres  $^{129}\text{Xe}$  RMN montrent à faible concentration (de l'ordre du micromolaire) un déplacement chimique du xénon différent selon l'état d'hybridation du brin d'ADN (Figure 66a).

À plus forte concentration (de l'ordre du millimolaire), les spectres xénon de la biosonde **56** seule et en présence d'un brin non complémentaire présentent un signal particulier avec trois pics principaux (Figure 66-2). Ceci peut s'expliquer par la formation d'aggrégats de type micelle, à cause du fort caractère hydrophobe du cœur cryptophane et du caractère hydrophile de l'ADN. Ce phénomène n'est pas observé en présence du brin d'ADN complémentaire qui apporte une très forte solubilité aqueuse à **56**.

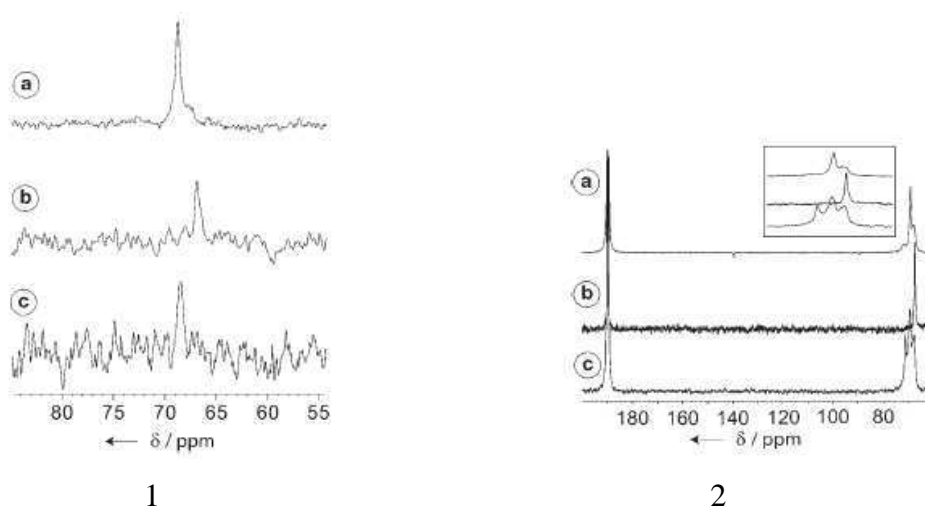


Figure 66 : spectres RMN  $^{129}\text{Xe}$  hyperpolarisé dans  $\text{D}_2\text{O}$

1 : à faible concentration (~ μM), (a) **56** seule, (b) **56** en présence d'un brin d'ADN complémentaire, (c) **56** en présence d'un brin d'ADN non complémentaire. 2 : à haute concentration (~ mM)



## Biosonde à pH

En 2010, les mêmes équipes se sont intéressées au cryptophane **35** (Figure 67) comme sonde à pH<sup>76</sup>. Cette biosonde permet la mesure d'un pH autour de 4,7 qui pourrait trouver une application dans la localisation de cellules de faible pH (cellule entrant en acidose). Comme décrit précédemment, cette biosonde est obtenue en 10 étapes non linéaires avec un rendement global de 1,4 % (Figure 51).

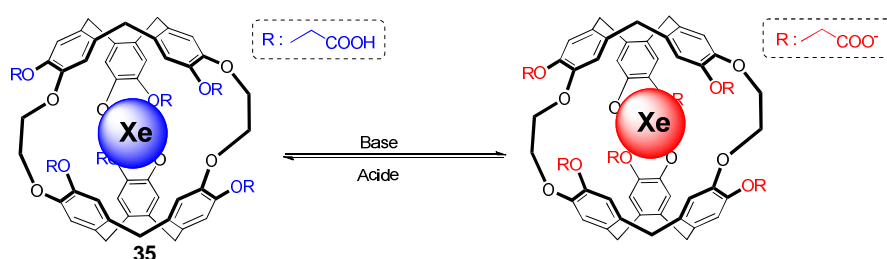


Figure 67 : biosonde à pH

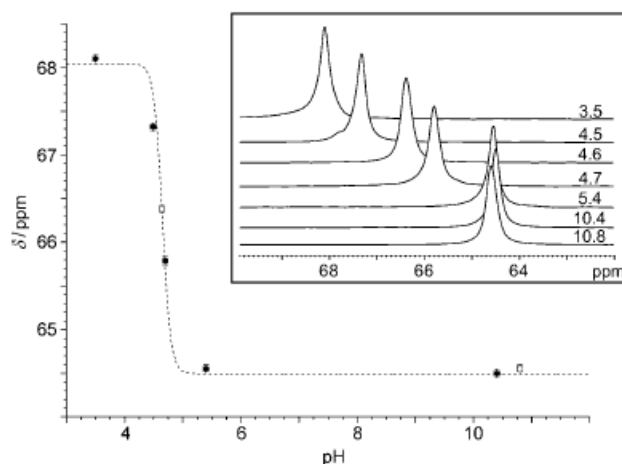


Figure 68 : spectres RMN  $^{129}\text{Xe}$  hyperpolarisé dans  $\text{D}_2\text{O}$  sur une gamme de pH de 3,5 – 10,8 et courbe de titration (déplacement chimique en fonction du pH) obtenue avec une solution de KOD. (Concentration en biosonde de 1 mM)

Les spectres RMN  $^{129}\text{Xe}$  (Figure 68) montrent une grande variation du déplacement chimique du xénon encapsulé d'environ 4 ppm entre un pH acide (3,5) et un pH basique (10,8). Le pKa des fonctions acide du cryptophane est évalué à  $4,65 \pm 0,05$  grâce à la courbe de titration du cryptophane (déplacement chimique du xénon en fonction du pH) ce qui est cohérent avec la littérature.

La transferrine est une bêta globuline, de poids moléculaire 76 kDa, synthétisée par le foie. Elle est constituée d'une seule chaîne polypeptidique porteuse de deux sites de captation du fer. La transferrine a pour rôle de transporter le fer de l'intestin vers les réserves hépatiques et vers les réticulocytes. Berthault, Dutasta et Brotin ont voulu greffer des cryptophanes à la surface de cette protéine<sup>107</sup>, qui est reconnue par un grand nombre de récepteurs spécifiques présents sur la membrane cellulaire puis internalisée par endocytose. L'idée est de permettre une visualisation IRM  $^{129}\text{Xe}$  à l'intérieur des cellules grâce à cette nouvelle biosonde.

Le cryptophane **60** est synthétisé en quatorze étapes non linéaires avec un rendement de 1,2 % (Figure 69). Ici, le cryptophane **7** est obtenu en une étape à partir du cryptophane-A.

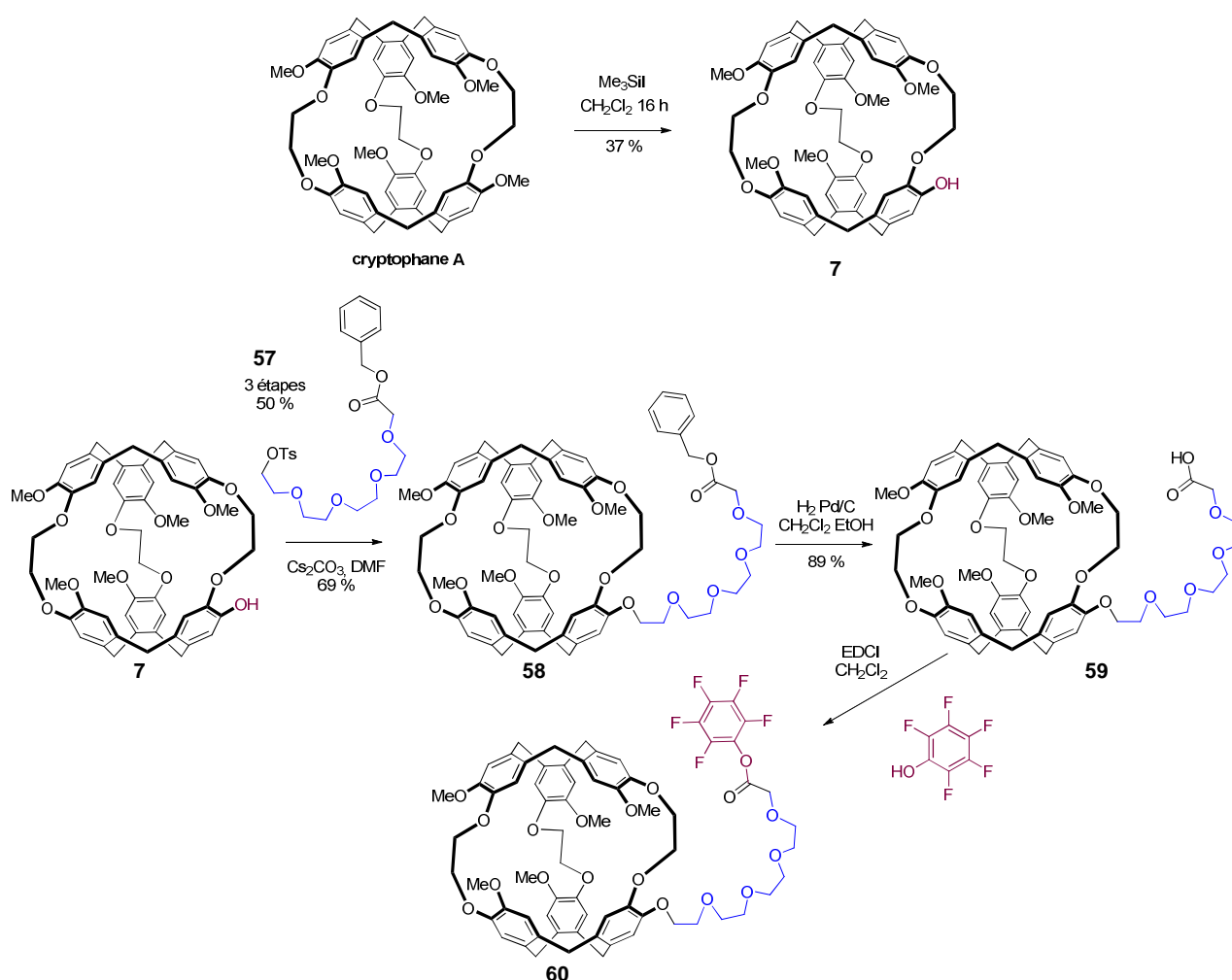


Figure 69 : nouvelle voie de synthèse du cryptophane **7** et synthèse du cryptophane activé **60**

<sup>107</sup> C. Boutin, A. Stopin, F. Lenda, T. Brotin, J.-P. Dutasta, N. Jamin, A. Sanson, Y. Boulard, F. Letaurtre, G. Huber, A. Bogaert-Buchmann, N. Tassali, H. Desvaux, M. Carrière, P. Berthault, *Bioorg. Med. Chem.*, **2011**, *19*, 4135

Le bras espaceur **57** est obtenu en trois étapes avec un rendement de 50 %. Le phénol libre de **7** réagit avec le composé tosylé **57** pour fournir le cryptophane **58** qui est ensuite déprotégé puis activé sous forme d'ester de pentafluorophénol pour donner **60**.

Ce cryptophane activé a été ensuite greffé sur la holotransferrine (comportant deux cations  $\text{Fe}^{3+}$ ) ou sur l'albumine de sérum bovin pour un contrôle négatif. Le ratio de cryptophanes greffés par protéine peut être contrôlé. L'ajout de marqueurs fluorescents sur la protéine a permis de voir par fluorescence la reconnaissance spécifique de la biosonde transferrine par les récepteurs ainsi que son endocytose. La présence de fluorophores ou de cryptophanes sur la surface de la protéine ne modifie donc pas ses propriétés biologiques.

Les expériences RMN  $^{129}\text{Xe}$  confirment la reconnaissance et l'endocytose de la sonde malgré la présence d'un signal supplémentaire inattendu qui correspondrait à une interaction non spécifique de la biosonde au sein de la membrane lipidique. Ce manque de spécificité provient très probablement de l'hydrophobicité des cryptophanes greffés.

Il est important de noter qu'il s'agit de la première RMN  $^{129}\text{Xe}$  hyperpolarisé à l'intérieur des cellules. Les expériences sont stables et reproductibles permettant la visualisation d'un système biologique complexe malgré la présence d'éléments paramagnétiques. Ces résultats sont très encourageants pour les applications *in vivo* futures.

### iii- Équipe de Dmochowski

L'équipe de Dmochowski s'est intéressée à la conception de trois biosondes à base de cryptophane pour le diagnostic précoce de cancers par IRM  $^{129}\text{Xe}$ .

#### 🚩 Biosonde MMP-7

En 2006, l'équipe publie une biosonde permettant de cibler la MMP-7 (matrilysine), une métalloprotéase matricielle surexprimée à la surface de nombreuses cellules cancéreuses, en particulier celles du poumon et du colon<sup>67</sup>.

Pour cela, un peptide reconnu spécifiquement par la MMP-7 a été attaché au cryptophane **6** pour former la biosonde **61**. Puis, sous l'action de la métalloprotéase, le peptide va être clivé pour donner **62** (Figure 70).

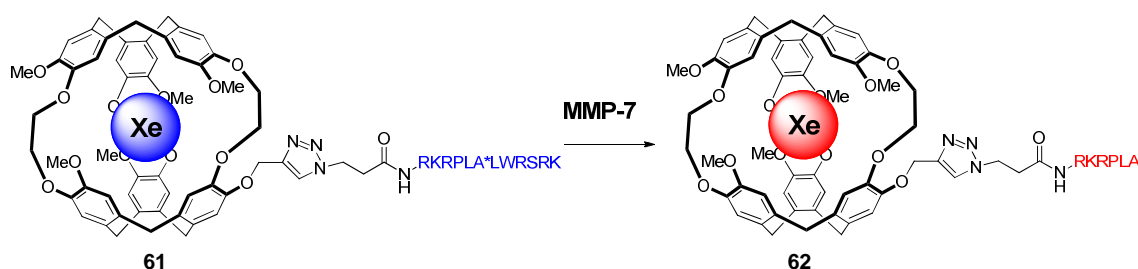


Figure 70 : biosonde MMP-7

Chacun des cryptophanes **61** et **62** est synthétisé en treize étapes non linéaires, sans tenir compte de la synthèse des peptides présentant une fonction azoture (**63** et **64**), avec un rendement de l'ordre de 1,9 % (Figure 71). Une étape finale permet d'obtenir **61** et **62** par cycloaddition de Huisgen catalysée au cuivre du cryptophane **6** portant une fonction alcyne terminal avec les peptides **63** ou **64** (Figure 71).

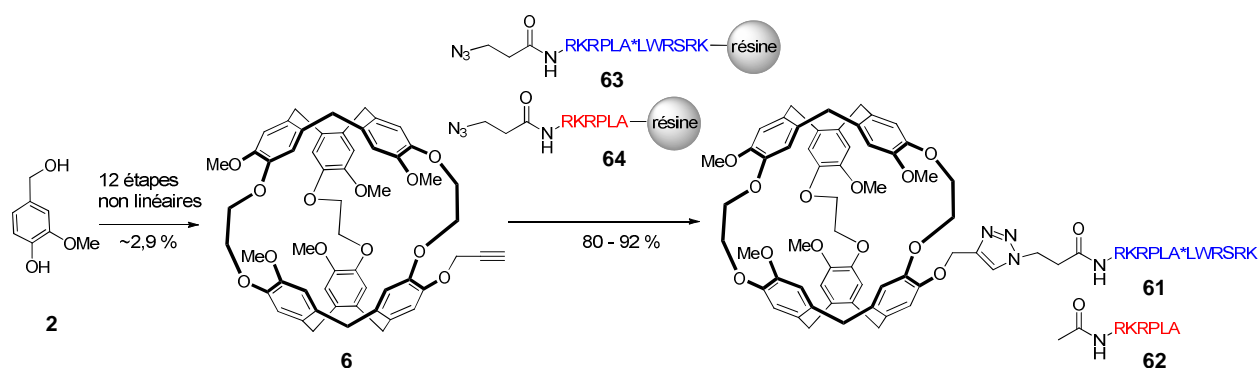


Figure 71 : schéma de synthèse de la biosonde MMP-7

Les peptides **63** ou **64** étant chiraux et énantiopurs, les sondes **61** et **62** sont un mélange de deux diastéréoisomères présentant deux pics en RMN  $^{129}\text{Xe}$  (Figure 72). La biosonde **61** seule présente deux pics à 61,8 et 62,4 ppm. Lorsque le peptide est clivé par la MMP-7, la formation de **62** se traduit par l'apparition de deux nouveaux signaux à 62,2 et 61,4 ppm. La faible différence de déplacement chimique du xénon entre **61** et **62** peut s'expliquer par le trop grand éloignement entre le xénon encapsulé et la séquence d'acides aminés éliminés par coupure enzymatique.

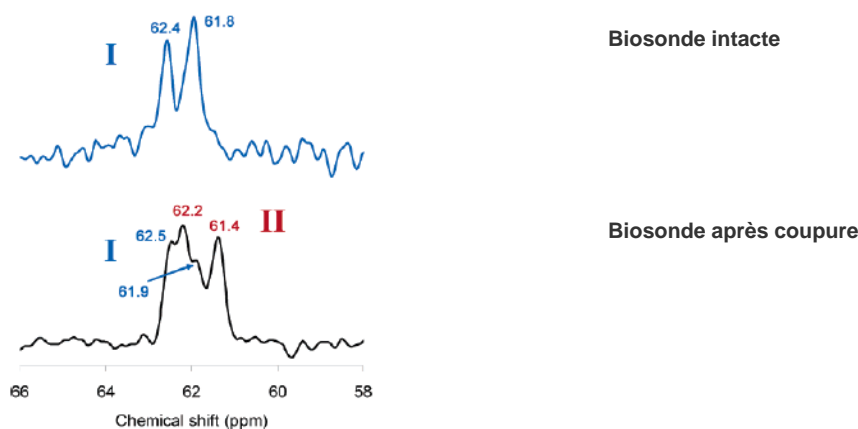


Figure 72 : spectres RMN  $^{129}\text{Xe}$  hyperpolarisé dans  $\text{D}_2\text{O}$  de **61** (en haut, 154  $\mu\text{M}$ , bleu) et du mélange (en bas) **61** (77  $\mu\text{M}$ , bleu) avec **62** (95  $\mu\text{M}$ , rouge)

#### Biosonde anhydrase carbonique

Les anhydrases carboniques (CAs) sont des métalloenzymes à zinc catalysant la réaction d'hydratation de  $\text{CO}_2$  pour former l'acide carbonique  $\text{H}_2\text{CO}_3$ . Elles sont souvent surexprimées

dans les cellules cancéreuses. Les principaux inhibiteurs de l'anhydrase carbonique comportent des groupements sulfonamines capables de coordonner l'ion  $\text{Zn}^{2+}$ . L'équipe de Dmochowski a réussi à obtenir une biosonde<sup>108,109</sup> ciblant les anhydrases carboniques I et II.

La biosonde est constituée d'un groupement sulfonamine couplé à un cryptophane hydrosoluble. Ce groupement chélate  $\text{Zn}^{2+}$  et forme ainsi un nouveau complexe d'anhydrase carbonique (Figure 73).

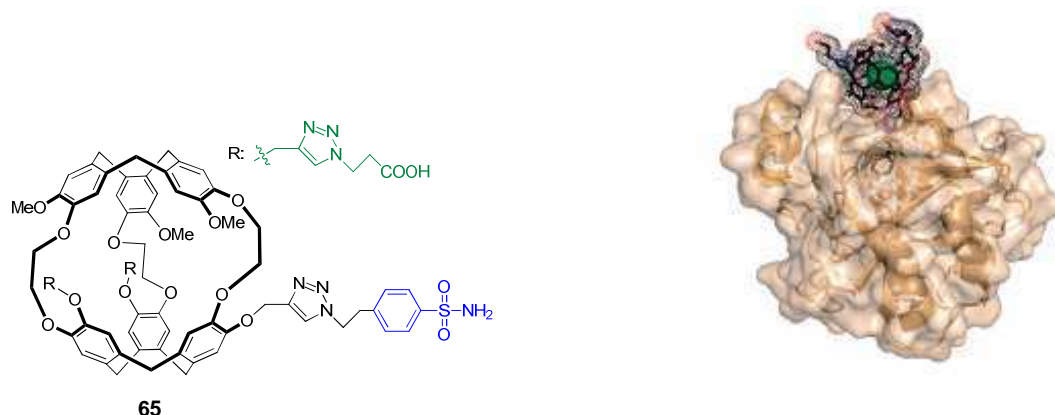


Figure 73 : biosonde anhydrase carbonique - À gauche : biosonde comportant le groupement sulfonamine (bleu) et des bras solubilisants (vert) - À droite : structure cristallographique montrant les interactions du cryptophane **65** encapsulant du xénon avec l'anhydrase carbonique II

La biosonde est synthétisée en treize étapes non linéaires avec un rendement de l'ordre de 1,2 %. Les trois triples liaisons du cryptophane **23** (Figure 74) ont été séquentiellement engagées avec deux ligands azotures différents : une première réaction de chimie *click* permet d'accéder aux composés **69**, **70** et **71** portant un groupement sulfonamine. Puis une seconde cycloaddition conduit aux composés **73**, **74** et **75** portant deux groupements acide carboxylique. Ces cryptophanes **73**, **74** et **75** se distinguent par la longueur du bras entre le cryptophane et le groupement sulfonamine (Figure 74).

<sup>108</sup> J. M. Chambers, P. A. Hill, J. A. Aaron, Z. Han, D. W. Christianson, N. N. Kuzma, I. J. Dmochowski, *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, 131, 563

<sup>109</sup> J. A. Aaron, J. M. Chambers, K. M. Jude, L. Di Costanzo, I. J. Dmochowski, D. W. Christianson *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, 130, 6942

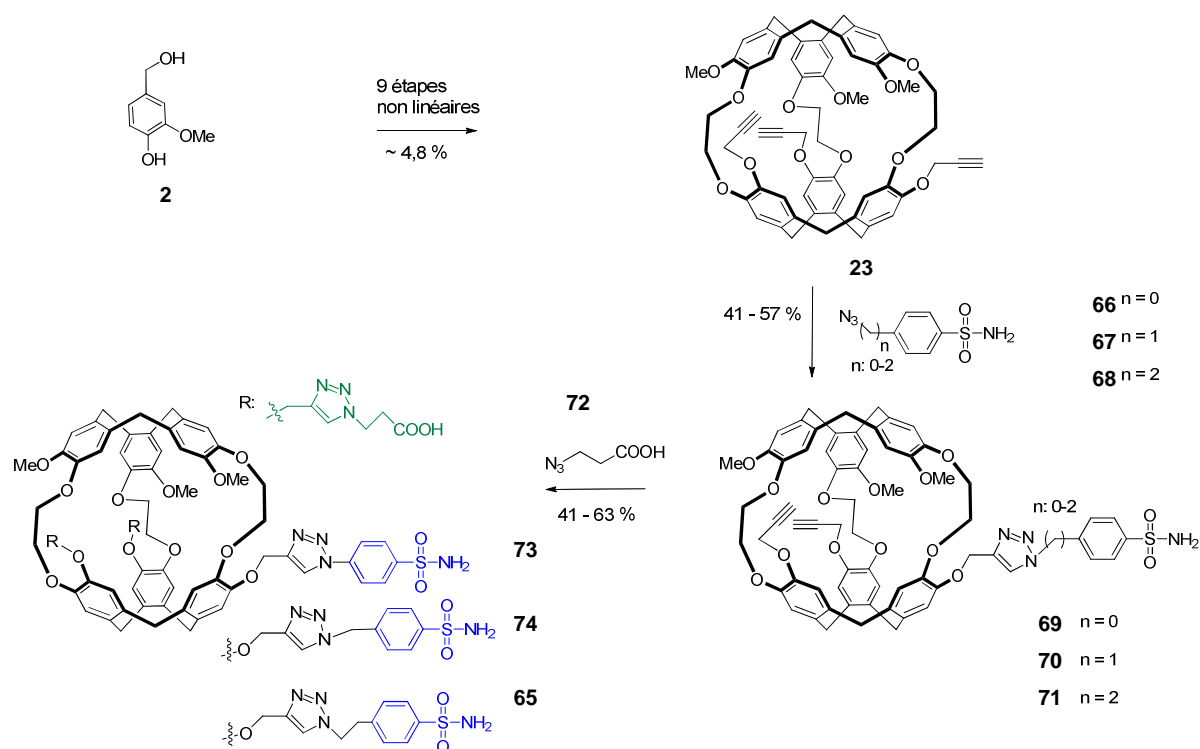


Figure 74 : schéma de synthèse des biosondes **73**, **74** et **65**

Le xénon encapsulé dans **73**, **74** et **65** montre une seule résonance respectivement à 63,5, 63,9 et 62,9 ppm (Figure 75a, c, e). L'addition d'anhydrase carbonique dans la solution contenant la biosonde induit une modification du déplacement chimique du xénon de 3 à 5 ppm (Figure 75b, d, f). Ce changement est plus important dans le cas du cryptophane **73** qui possède le bras le plus court entre le cryptophane et le groupement sulfonamine (Figure 75a et b).

Pour le cryptophane **65** complexé à l'anhydrase carbonique, deux pics apparaissent à 67,9 et 66,3 ppm (Figure 75f). L'anhydrase carbonique étant chirale, on observe la formation de deux diastéréoisomères. Pour les cryptophanes **73** et **74** complexés avec l'anhydrase carbonique, on ne voit qu'un pic apparaître. Selon Dmochowski, les deux cryptophanes énantiomères complexés sont trop proches de l'environnement de la protéine et produisent des signaux en RMN  $^{129}\text{Xe}$  équivalents (Figure 75b, d).

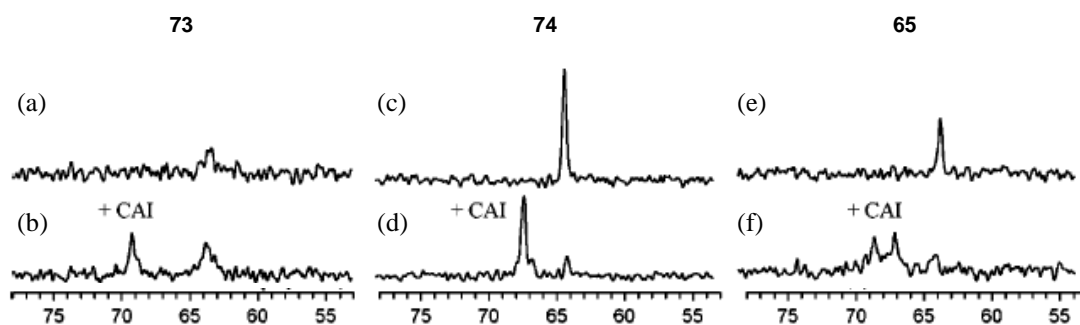


Figure 75 : spectres RMN  $^{129}\text{Xe}$  hyperpolarisé des différentes biosondes dans 50 mM d'un tampon Tris, pH 8.0 (a,c,e) : spectres RMN  $^{129}\text{Xe}$  des biosondes seules en solution, (b,d,f) : spectres RMN  $^{129}\text{Xe}$  des biosondes en présence de CAI (a) **73** seule (96  $\mu\text{M}$ ); (b) **73** (188  $\mu\text{M}$ ) et CAI (141  $\mu\text{M}$ ); (c) **74** seule (186  $\mu\text{M}$ ); (d) **74** (136  $\mu\text{M}$ ) et CAI (100  $\mu\text{M}$ ); (e) **65** seule (121  $\mu\text{M}$ ); (f) **65** (189  $\mu\text{M}$ ) et CAI (141  $\mu\text{M}$ )

#### Biosonde RGD

Les intégrines sont des glycoprotéines hétérodimériques responsables de nombreux phénomènes d'adhésion d'une part entre cellules et d'autre part entre cellules et matrice extracellulaire. Leur dysfonctionnement peut engendrer des maladies telles le développement et la dispersion des tumeurs cancéreuses. En particulier, les intégrines  $\alpha_v\beta_3$  jouent un rôle crucial dans ces maladies. La séquence de trois acides aminés arginine - glycine - acide aspartique (RGD) correspond au site de liaison de plusieurs intégrines et a servi de base à la conception de nombreux inhibiteurs de l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$ .

L'équipe de Dmochowski s'est intéressée à la synthèse de biosondes cryptophane qui ciblent spécifiquement les cellules surexprimant les récepteurs intégrines  $\alpha_v\beta_3$  à l'aide d'un peptide linéaire tetra-RGD<sup>110</sup> (Figure 76) ou d'un peptide cyclique RGD (Figure 77)<sup>111</sup>.

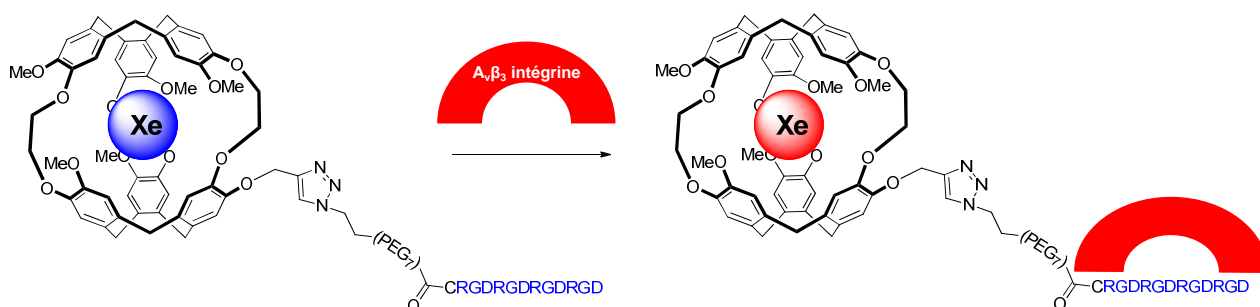


Figure 76 : biosonde pour la détection du complexe peptide linéaire tétra-RGD/ $\alpha_v\beta_3$  intégrine

<sup>110</sup> G. K. Seward, Q. Wei, I. J. Dmochowski, *Bioconjugate Chem.* **2008**, *19*, 2129

<sup>111</sup> G. K. Seward, Y. Bai, N. S. Khan, I. J. Dmochowski, *Chem. Sci.*, **2011**



La biosonde constituée d'un cryptophane lié au peptide linéaire tétra-RGD est une des sondes utilisée par l'équipe de Dmochowski pour faire les premières études de toxicité et d'internalisation cellulaire (par marquage fluorescent des sondes). Les cryptophanes testés n'ont pas révélé de toxicité notable aux concentrations nécessaires pour l'IRM  $^{129}\text{Xe}$ .

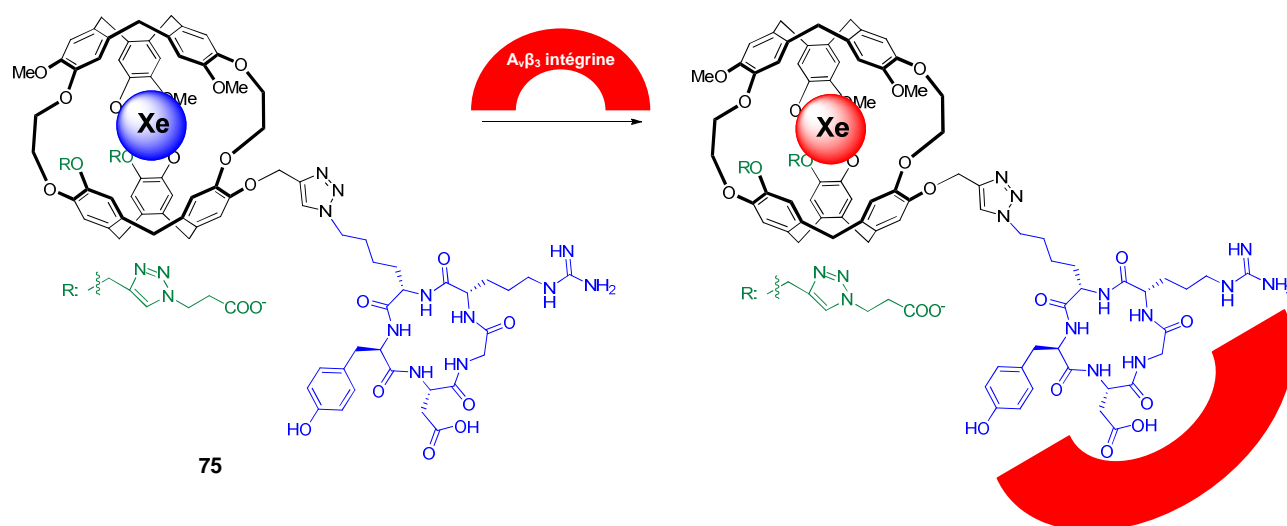


Figure 77: biosonde **75** pour la détection du complexe peptide cyclique RGD/ $\alpha_v\beta_3$  intégrine

Les RGD cycliques (c[RGDyK]) sont connus pour cibler les récepteurs intégrines  $\alpha_v\beta_3$  avec une affinité environ dix fois supérieure à celle des tétra-RGD linéaires. Dans cette partie, on s'intéressera plus particulièrement à l'étude du cryptophane couplé au peptide RGD cyclique.

La biosonde **75** est obtenue en neuf étapes non linéaires, sans tenir compte de la synthèse du peptide RGD (Figure 78). Le cryptophane **23** fonctionnalisé par le RGD cyclique est rendu partiellement hydrosoluble. Une première cycloaddition de Huisgen conduit au composé **77** comportant le RGD **76**. Puis, une seconde cycloaddition permet d'accéder à la biosonde **75** portant deux groupements acide carboxylique.

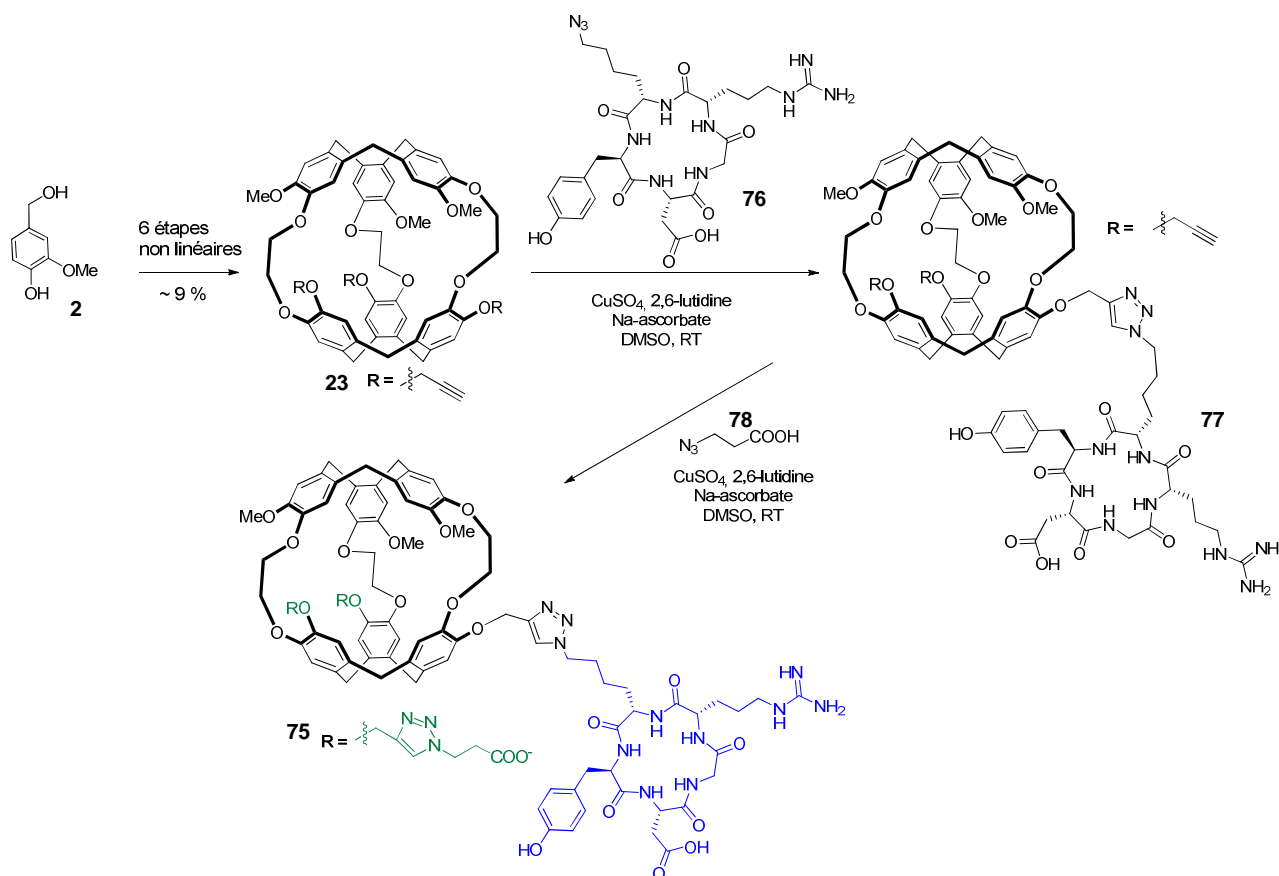


Figure 78: schéma de synthèse de la biosonde  $\alpha_v\beta_3$  intégrine **75**

Le spectre RMN  $^{129}\text{Xe}$  de la biosonde **75** seule montre un unique signal à 65,8 ppm (Figure 79a). L'ajout de récepteurs intégrines  $\alpha_v\beta_3$ , provoque l'apparition d'un second pic à 71,2 ppm, correspondant au xénon encapsulé dans le complexe biosonde/ $\alpha_v\beta_3$  intégrine (Figure 79b). En présence d'un excès de peptide cyclique libre c[RGDyK], le complexe peptide libre/intégrine se forme préférentiellement par rapport au complexe biosonde/intégrine et le pic correspondant à ce dernier disparaît (Figure 79c).

Ces cryptophanes ont montré des toxicités modérées et sont internalisé à hauteur de 1  $\mu\text{M}$  spécifiquement dans les cellules comportant ces récepteurs intégrines.

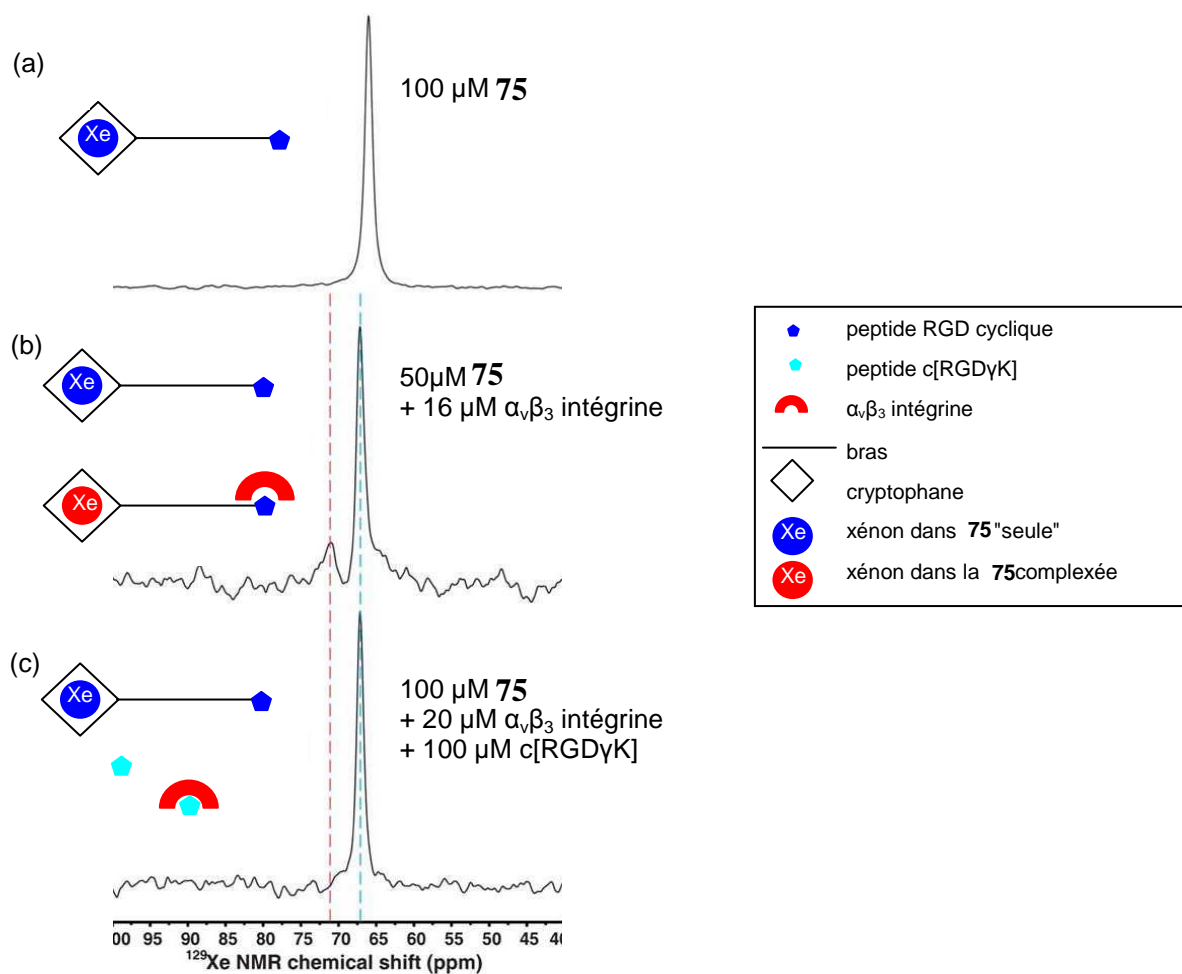


Figure 79: spectres RMN  $^{129}\text{Xe}$  hyperpolarisé obtenus de **75** seule (a), en présence  $\alpha_v\beta_3$  intégrine (b) et en présence du peptide c[RGD $\gamma$ K] (c) – tampon Tris (1mM, pH 7,2)

Les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe II sont des glycoprotéines membranaires fixant des centaines de peptides différents pour les présenter aux récepteurs des lymphocytes T. Elles peuvent jouer un rôle important dans le développement de maladies auto-immunes. L'équipe de Freund a mis au point en 2009 la synthèse d'une biosonde RMN  $^{129}\text{Xe}$  pour détecter la formation du complexe peptide antigénique / protéines CMH de type II68. Ces auteurs se sont intéressés aux interactions entre le peptide HA, de séquence PKYVKQNTLKLAT, issu de l'hémagglutinine du virus influenza, et la molécule du CMH HLA-DR1 (Figure 80).

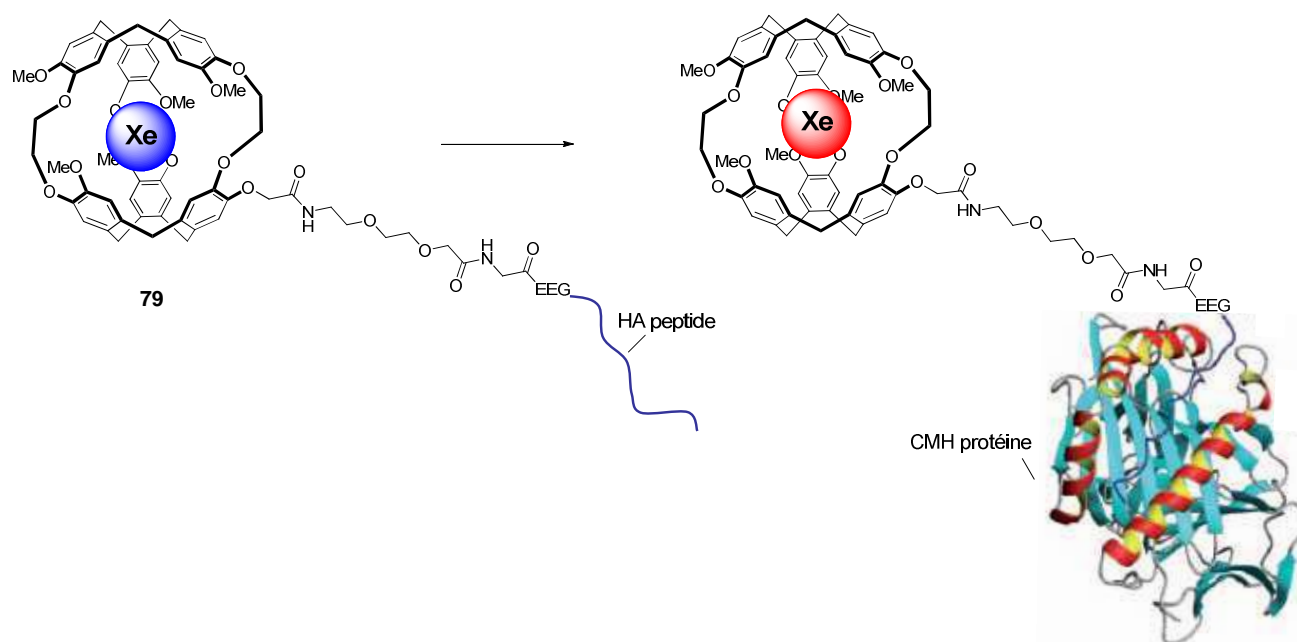


Figure 80: biosonde pour la détection du complexe peptide antigénique/CMH II

La biosonde **79** est synthétisée à partir du cryptophane **8**. Le peptide HA est couplé au cryptophane par l'intermédiaire d'un bras espaceur composé d'un petit peptide PEGylé hydrosoluble.

Le spectre RMN  $^{129}\text{Xe}$  montre un écart de déplacement chimique de 1 ppm entre **79** seule et **79** complexée à la protéine (Figure 81).

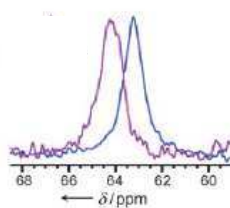


Figure 81: spectres RMN  $^{129}\text{Xe}$  hyperpolarisé obtenus de **79** seule (bleu) et en présence de CMH (violet). Concentration en biosonde de (10  $\mu\text{M}$ ) dans  $\text{D}_2\text{O}$

## C. Conclusions et objectifs

La technique d'Imagerie par Résonance Magnétique du xénon pallie efficacement le manque de sensibilité inhérent à la RMN. Elle permet de faire de l'imagerie fonctionnelle grâce à des biosondes conçues à partir de cryptophanes décorés par une antenne de reconnaissance spécifique des cibles d'intérêt. Les études actuelles se font dans l'eau, ou dans des solutions tampon à pH physiologique, mais aussi dans le plasma humain ou dans des environnements lipidiques. Avec la preuve d'internalisation cellulaire des cryptophanes et les premiers protocoles pour l'observation de signaux RMN  $^{129}\text{Xe}$  au sein des cellules, les chercheurs s'approchent pas à pas des premières applications *in vivo*.

Il reste pourtant encore beaucoup de chemin à faire. Il est notamment nécessaire de mieux comprendre et d'optimiser les propriétés d'encapsulation du xénon au sein des cryptophanes. C'est pourquoi, dans une première partie de ma thèse, nous nous sommes intéressés à la synthèse de nouvelles cages, en variant soit la longueur, soit la nature des chaînes reliant les deux CTV.

Par la suite, nous nous sommes penchés sur de nouvelles cibles biologiques d'intérêt que sont les métaux. Nous avons donc voulu synthétiser une biosonde afin d'en détecter des concentrations physiologiques (ce qui n'est souvent pas possible par des techniques d'IRM classiques).

Enfin, en dernière partie, nous nous sommes fixés comme objectif de synthétiser la première sonde bimodale IRM  $^{129}\text{Xe}$  et fluorescence pour le marquage de protéines "taguées" cystéine. En effet, comme mentionné en introduction, les différentes techniques d'imagerie se révèlent souvent complémentaires.



## **II. DE NOUVEAUX CRYPTOPHANES POUR** **LE XÉNON**





## **II. De nouveaux cryptophanes pour le xénon**

Depuis la découverte de l'encapsulation du xénon par les cryptophanes, les chercheurs n'ont eu de cesse d'améliorer ces molécules cages afin d'affiner leurs propriétés et de trouver de meilleurs candidats pour des applications en IRM  $^{129}\text{Xe}$ . Pour cela, ils peuvent jouer principalement sur trois paramètres :

### La nature des substituants sur les cycles aromatiques

Les substituants des cycles aromatiques modulent notamment la taille des portails d'entrée et sortie du xénon. Par exemple, pour le composé hexaphénolate **34** (Figure 50), la nature des contre-ions jouent un rôle important sur l'encapsulation du xénon, probablement parce que selon leur taille, ils peuvent bloquer l'accès au cryptophane<sup>76</sup>.

### La longueur des chaînes pontantes

Comme discuté en partie I.B.2.e)-ii, la longueur des chaînes fait clairement varier la taille des cavités internes et des portails d'entrée et sortie du xénon.

### La nature des chaînes pontantes

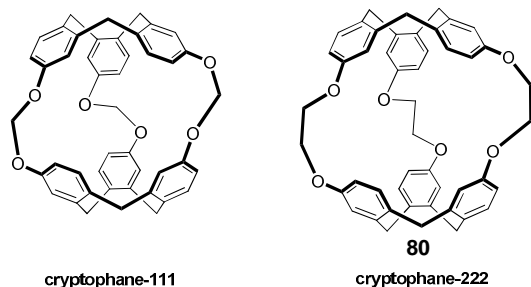
Bien que le xénon n'ait jamais été encapsulé dans des cages aux chaînes pontantes différentes, l'utilisation d'autres hétéroatomes, ou de liens plus rigides change la géométrie de la cage et devrait influencer sur ses propriétés d'encapsulation.

Dans cette partie, nous avons donc voulu faire varier ces deux derniers paramètres.

## **A. Cages de cavités intermédiaires**

L'influence de la longueur des chaînes pontantes des cryptophanes a déjà largement été explorée<sup>99</sup>. Cependant, depuis la synthèse du cryptophane-111 qui possède la meilleure affinité<sup>64</sup>, aucune équipe ne s'est intéressée à l'obtention des cryptophanes intermédiaires entre cryptophanes -111 et -222 alors que ces derniers présentent des propriétés d'encapsulation complémentaires. En effet, si le cryptophane-111 possède le volume de cavité le plus adapté pour garantir la meilleure constante d'affinité, les cryptophanes de type-222

restent de bons candidats grâce à leurs plus grandes vitesses d'échange (Tableau 8). Rappelons que ce paramètre est extrêmement important pour permettre un remplissage constant de la cage par du xénon hyperpolarisé frais afin de garder un bon signal en RMN  $^{129}\text{Xe}$ .



	Cryptophane-111	Cryptophane-222
Constante d'affinité (278 K)	28000 M <sup>-1</sup>	1400 M <sup>-1</sup>
Vitesse d'échange (293 K)	2,4 Hz	~8000 Hz

Tableau 8 : propriétés d'encapsulation des cryptophanes -111 et -222 dans (CDCl<sub>2</sub>)<sub>2</sub>

Dans cette partie, nous nous sommes intéressés à la synthèse de nouveaux cryptophanes -112 et -122<sup>112</sup> qui pourraient présenter des propriétés intermédiaires entre cryptophane-111 et cryptophane-222 du fait de leurs tailles de cavité intermédiaires (Figure 82).

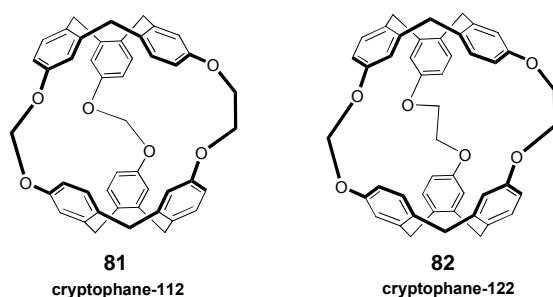


Figure 82 : cryptophanes -112 et -122

## 1. Synthèse

### a) Une nouvelle stratégie

La difficulté de synthèse de ces nouvelles cages provient essentiellement de la présence de ponts acétals entre les phénols des CTV. Les stratégies classiques (méthode directe et

<sup>112</sup> N. Kotera, L. Delacour, T. Traoré, N. Tassali, P. Berthault, D-A. Buisson, J.-P. Dognon, B. Rousseau, *Org. Lett.*, **2011**, 13, 9

méthode template) passent par une cyclotrimérisation finale en conditions acide qui ne peuvent s'appliquer pour la synthèse de nos molécules (Figure 83). De plus, la méthode de couplage n'a pour l'instant été appliquée que pour l'obtention de cage de symétrie  $D_3$ .

Nous avons pensé, afin d'obtenir des chaînes de longueurs différentes, à isoler des intermédiaires ouverts en appliquant la méthode de couplage utilisée dans la synthèse du cryptophane-111.

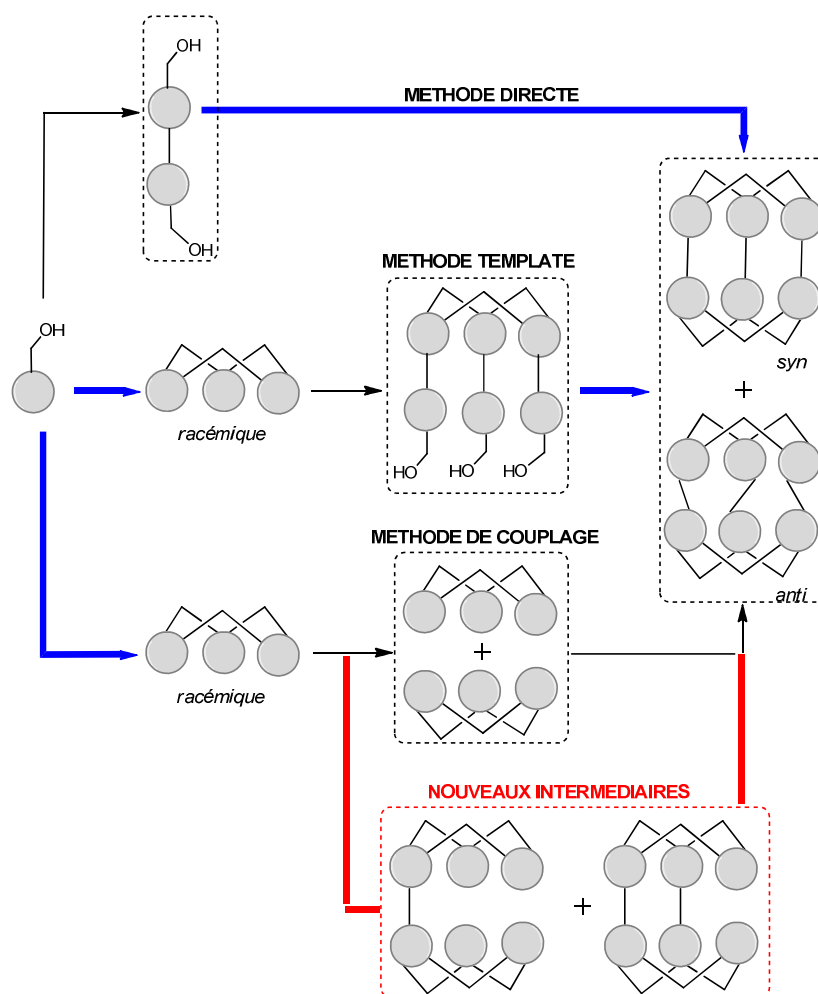


Figure 83 : stratégie de synthèse des nouvelles cages par formation de nouveaux intermédiaires ouverts (les étapes en conditions acide apparaissent en bleu)

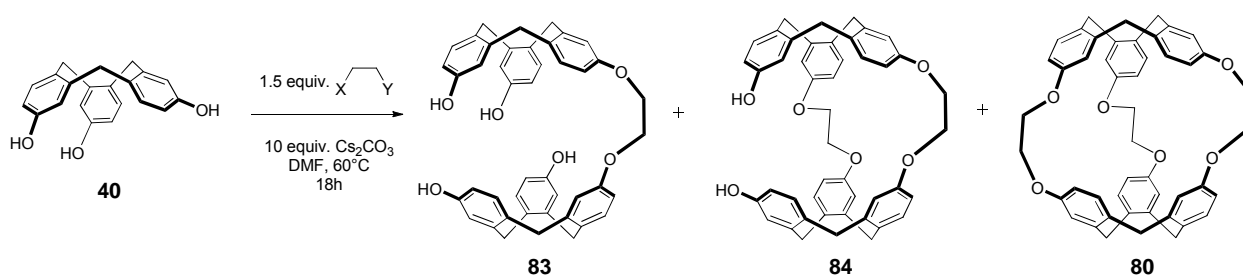
#### b) Les intermédiaires ouverts

Le cyclotriphénolène **40** est obtenu en 4 étapes avec un rendement d'environ 30 % par une procédure développée au laboratoire décrite précédemment (Figure 53 et Tableau 9).

Différents essais ont été ensuite effectués afin d'optimiser les rendements d'obtention des intermédiaires **83** et **84**.

### *i- Différents bras espaceurs*

Dans un premier temps, nous avons testé différents bras espaceurs pour obtenir les cages ouvertes avec un ou deux ponts éthylènedioxy. Le cyclotriphénolène **40** est mis en présence de 1,5 équivalents d'agent pontant et 10 équivalents de base dans le DMF à 60°C. Les réactions ont été suivies par LC/MS au cours du temps. Les rendements calculés par LC/MS au bout de 18 h sont présentés dans le Tableau 9.



Entrée	Bras espaceur	Rdt de <b>83</b> (%)	Rdt de <b>84</b> (%)	Rdt de <b>80</b> (%)
1	X=Y=Br	46	5	0
2	X=Br; Y=OTs <sup>113</sup>	29	5	0
3	X=Y=OMs <sup>114</sup>	5	12	30
4	X=Y=OTs	0	0	27
5	X=Y=OTf <sup>115</sup>	3	0	0

Tableau 9 : rendements des différents intermédiaires **83** et **84** et du cryptophane-222 avec différents bras espaceurs

Le dibromoéthane et le bromoéthanol tosylé (entrées 1 et 2) conduisent tous deux aux intermédiaires désirés avec des rendements acceptables. Cependant, la réaction est lente, et après 18 h à 60 °C, il reste encore du cyclotriphénolène de départ. Les agents pontants mésylés et tosylés (entrées 3 et 4) conduisent aux produits beaucoup plus vite avec l'apparition des intermédiaires après quelques heures. Ces composés ont de meilleurs groupements partant et présentent par conséquent une meilleure réactivité. Après 18 h, le

<sup>113</sup> T. Nanno, M. Deguchi, Patent US2008/306308 A1 **2008**.

<sup>114</sup> C. Tahtaoui, I. Parrot, P. Klotz, F. Guillier, J.-L. Galzi, M. Hibert, B. Ilien, *J. Med. Chem.* **2004**, 47, 4300.

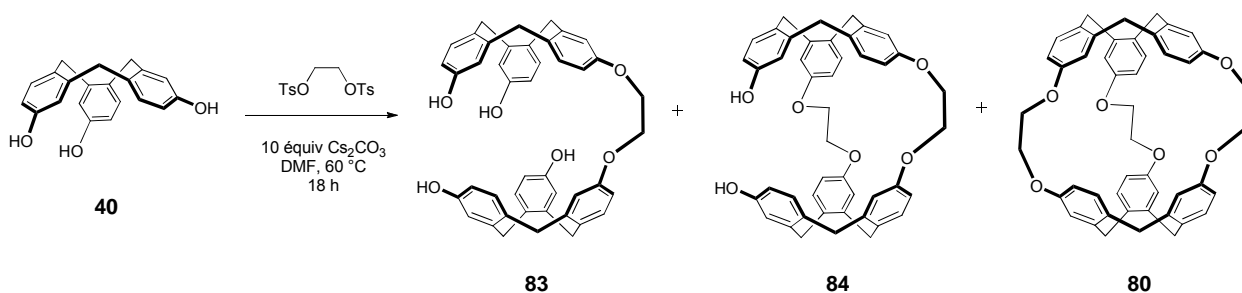
<sup>115</sup> M. F. Salomon, R. G. Salomon, *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, 101, 4290.

produit de départ est entièrement consommé et dans le cas de l'éthylène glycol bistosylé, les intermédiaires sont entièrement convertis en cryptophane-222. Des produits secondaires de type polymères sont formés dans les deux cas de manière égale. La réaction avec l'éthylène glycol bistriflé conduit à la formation majoritaire de produits secondaires avec des traces de composé **83** avec une conversion complète et rapide du produit de départ.

Pour la suite, nous avons choisi de travailler avec le composé bistosylé qui permet de former le plus rapidement les intermédiaires.

### *ii- Ratio optimal entre bras espaceur et cyclotriphénolène*

Nous avons ensuite déterminé le ratio optimal entre bras espaceur et cyclotriphénolène pour obtenir les intermédiaires ouverts **83** et **84**. Le cyclotriphénolène **40** est engagé avec un nombre d'équivalents d'éthylène glycol bistosylé différent, 10 équivalents de base dans le DMF à 60 °C pendant 18 h. Les rendements calculés par LC/MS des intermédiaires **83** et **84** sont répertoriés dans le Tableau 10. 0,5 équivalent d'agent pontant maximise le rendement de **83**. 1,2 équivalents sont nécessaires pour former l'intermédiaire **84** majoritaire. Enfin, le cryptophane-222 peut être observé à hauteur de 26 % de rendement pour 1,5 équivalents de bras espaceur. L'ajout d'agent pontant au-delà de 1,5 équivalents favorise la formation de produits secondaires sans améliorer le rendement en composé **80**.



Équiv de linker	Rdt de <b>83</b> (%)	Rdt de <b>84</b> (%)	Rdt de <b>80</b> (%)
0,5	40	7	0
1,0	16	8	0
1,2	17	9	13
1,4	0	6	18
1,5	0	0	26

Tableau 10 : rendements des différents intermédiaires **83** et **84** et du cryptophane-222 avec un nombre d'équivalents de bras espaceur différent

Les intermédiaires sont ensuite isolés après réactions dans ces conditions optimisées. Le composé **83** est obtenu par réaction du cyclotriphénolène **40** avec 0,5 équivalent de bras espaceur avec 30 % de rendement après purification par chromatographie sur phase inverse. L'intermédiaire **84** est synthétisé en présence de 1,2 équivalents d'éthylène glycol bistosylé avec 6 % de rendement après purification par chromatographie en phase normale. Une colonne chromatographique phase normale et plusieurs extractions sont nécessaires pour purifier le cryptophane-222 qui n'a jamais été obtenu avec plus de 1,5 % de rendement. Comme pour la synthèse des cryptophanes -111 et -A, seul le cryptophane-222 *anti* a été observé.

### c) Couplage final et caractérisation

Enfin, les composés **83** et **84** sont engagés avec un excès de chlorobromométhane dans le DMF à 80 °C en présence de 10 équivalents de base pendant 18 h pour donner les cryptophanes -112 et -122 avec des rendements modestes de 27 et 23 % (Figure 84).

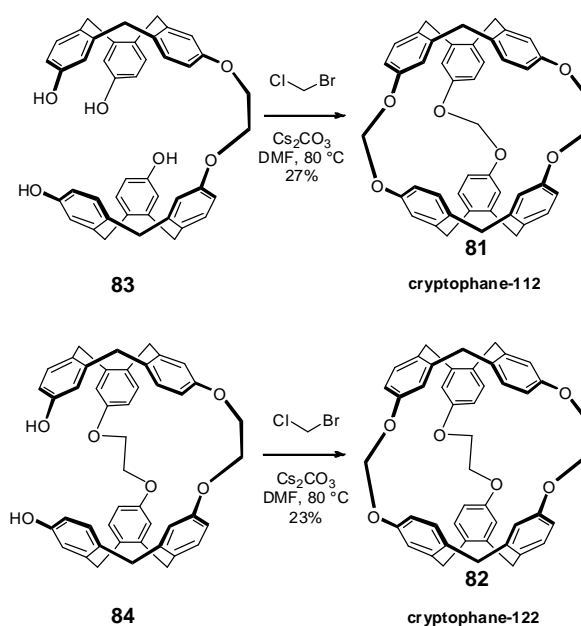


Figure 84 : couplage final pour l'obtention des cryptophanes -112 et -122

Les deux cryptophanes obtenus sont ensuite analysés sur colonne HPLC chirale pour déterminer leur stéréochimie. Sous détection UV, chacun des deux produits présentent deux pics de même intensité qui ne peuvent être attribués qu'aux deux énantiomères de la forme

chirale *anti*. Ces deux pics d'aires égales sont de signes opposés lorsqu'ils sont analysés par HPLC chirale couplée à un détecteur à dichroïsme circulaire, ce qui confirme la chiralité de nos deux composés. Cette synthèse a été récemment publiée<sup>112</sup>.

## 2. Propriétés d'encapsulation du xénon

Les caractérisations des interactions de cryptophanes avec le xénon ont été entièrement menées par le Dr. Patrick Berthault et son équipe au Laboratoire de Structure et Dynamique par Résonance Magnétique (LSDRM) au CEA à Saclay.

Les expériences de SPINOE permettent de basculer la magnétisation du xénon vers le proton, lorsque ces atomes sont suffisamment proches dans l'espace. Il est ainsi possible de savoir si le xénon est encapsulé au sein des cryptophanes étudiés.

Sur le spectre obtenu par séquence SPINOE de l'intermédiaire **84** ouvert, rien n'apparaît. Les protons n'ont pas interagi avec le xénon car le composé n'encapsule pas le gaz noble.

Par contre, pour les cryptophanes -112 et -122, la magnétisation est bien transférée aux protons des cages, ce qui signifie qu'ils encapsulent bien le xénon. L'exemple du spectre SPINOE du cryptophane-112 est présenté dans la Figure 85.

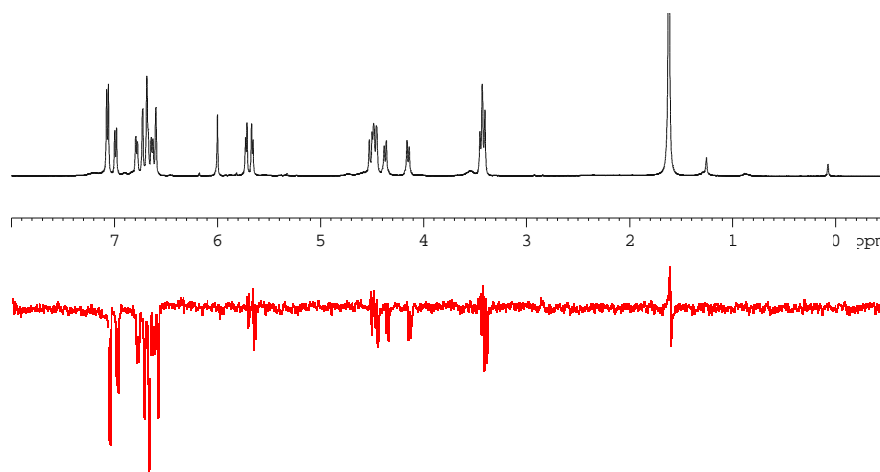


Figure 85 : spectre proton (noir) et spectre SPINOE (rouge) du cryptophane-112

Pour les deux composés d'intérêt, les spectres RMN  $^{129}\text{Xe}$  montrent un pic large dans la zone du xénon encapsulé au sein des cryptophanes respectivement à 52 et 63 ppm dans le tétrachloroéthane à 278 K (Figure 86). Cela confirme l'encapsulation du xénon au sein des cages.

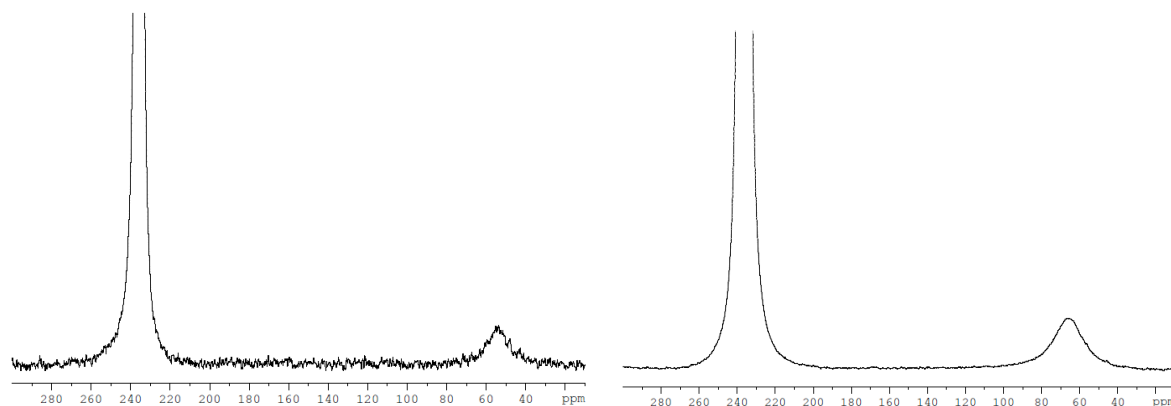


Figure 86 : spectres RMN  $^{129}\text{Xe}$  à 273 K dans le tétrachloroéthane (a) du cryptophane-112 et (b) du cryptophane-122. Le pic large à plus de 200 ppm correspond au xénon libre dans le tétrachloroéthane.

#### a) Constante d'affinité

La symétrie  $C_2$  de ces deux cages rend les spectres protons complexes et l'évaluation des constantes d'affinité est alors difficile. Des mesures par ITC pourraient permettre d'accéder plus aisément à de bons ordres de grandeur de constantes d'affinité.

#### b) Vitesse d'échange

La largeur des pics en RMN  $^{129}\text{Xe}$  est directement corrélée à la vitesse d'échange. Les pics étant larges, la vitesse d'échange est donc élevée pour ces deux composés. De plus, à température ambiante, les pics disparaissent, cela témoigne d'un échange rapide à l'échelle de la RMN. C'est la première fois que des cryptophanes étudiés pour l'encapsulation du xénon montrent un échange rapide à l'échelle de la RMN. Ce résultat, tout à fait inattendu, est extrêmement intéressant. Ces cryptophanes dont on attendait des propriétés intermédiaires entre cryptophanes -111 et -222 ont en fait une vitesse d'échange même plus grande que celle du cryptophane-222.



## B. Des ponts originaux pour les cryptophanes

Outre la longueur des chaînes, les chercheurs ont aussi modifié la nature des chaînes qui relient les CTV entre eux<sup>61,62,63,65</sup> (Figure 87). À notre connaissance, ces cages n'ont cependant pas trouvé d'applications pour l'IRM  $^{129}\text{Xe}$ . Elles sont en général inadaptées à la taille du xénon : trop grandes ou trop petites.

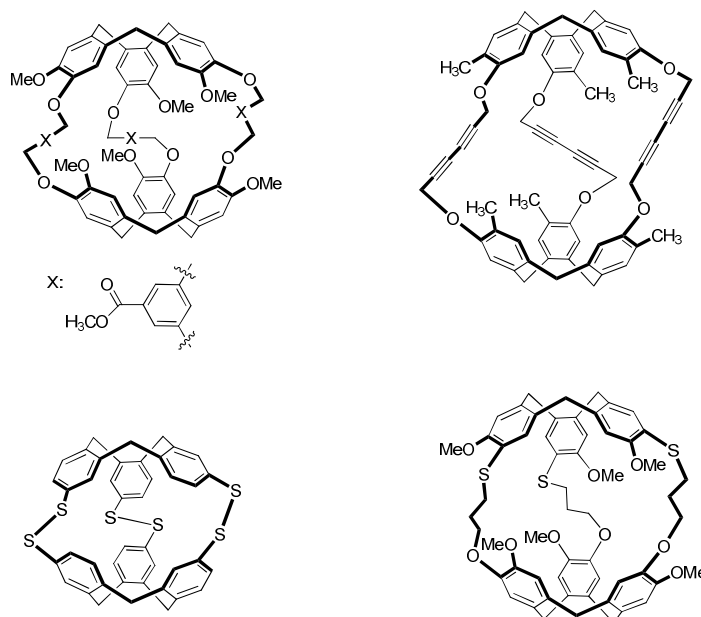


Figure 87 : exemples de cryptophanes possédant des ponts originaux

Dans l'idée de concevoir de nouveaux outils pour la RMN  $^{129}\text{Xe}$ , nous nous sommes intéressés à l'introduction d'atomes d'azote dans les ponts des cryptophanes afin de changer l'environnement du xénon encapsulé et évaluer leur influence sur les propriétés d'encapsulation.

### 1. Cryptophanes aux ponts azotés dans la littérature

Les seuls cryptophanes connus à ce jour comportant un atome d'azote au niveau des chaînes reliant les deux CTV entre eux ont été synthétisés par Warmuth<sup>116,117</sup> (Figure 88). Ils sont obtenus par auto-assemblages de différentes diamines avec des CTV substitués par des

<sup>116</sup> D. Xu, R. Warmuth, *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, 130, 7520

<sup>117</sup> C. Givélet, J. Sun, D. Xu, T. J. Emge, A. Dhokte, R. Warmuth, *Chem. Commun.*, **2011**, 47, 4511

groupements aldéhydiques en présence de molécules adaptées jouant le rôle de template. Le xénon n'a pas été testé comme hôte dans ces travaux.

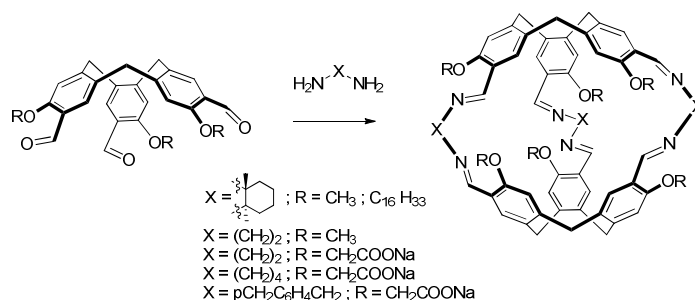


Figure 88 : cryptophanes à ponts azotés formés par auto-assemblage par l'équipe de Warmuth

## 2. Synthèse de cryptophaniline

Nous nous sommes intéressés à l'introduction d'un atome d'azote à la place d'un atome d'oxygène sur les dérivés de cryptophane-222 avec plusieurs objectifs :

- ✚ Rendre le couplage entre deux CTV différents facile
- ✚ Concevoir une cage fonctionnalisable sur ces atomes d'azote
- ✚ Etudier l'influence de l'azote sur l'encapsulation du xénon

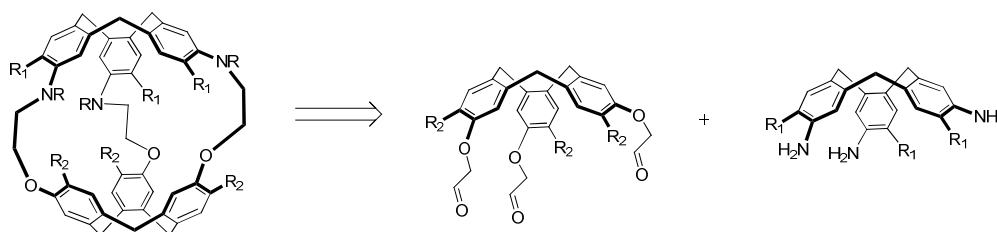


Figure 89 : schéma rétrosynthétique de l'élaboration des cryptophanilines

De tels cryptophanes pourraient être obtenu par amination réductrice entre un CTV trianiline et un CTV trialdéhyde (Figure 89). Nous appellerons ces cages des cryptophanilines.

### a) Synthèse des CTV trianiline

Le CTV **89** est obtenu suivant les travaux de Collet sur les CTV azotés<sup>118,119</sup> en 4 étapes à partir du monomère **85** (Figure 90).

<sup>118</sup> C. Garcia, J. Malthête, A. Collet, *Bull Soc Chim Fr*, **1993**, 130, 93

<sup>119</sup> C. Garcia, A. Collet, *Bull Soc Chim Fr*, **1995**, 132, 52

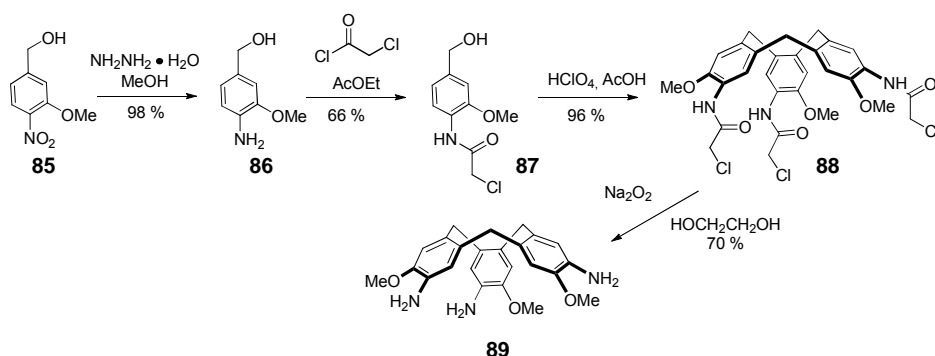


Figure 90 : schéma de synthèse du CTV **89**

Nous avons également réussi à obtenir le CTV **91** à partir du cyclotriphénolène **40** en 2 étapes (Figure 91). Le cyclotriphénolène est converti en CTV **90** en présence d'anhydride triflique dans la pyridine avec un rendement de 75 %. Les triflates sont substitués en présence de palladium puis les benzophénonimines sont directement hydrolysées avec une solution d'acide chlorhydrique afin d'obtenir les anilines avec un rendement non optimisé de 16 %.

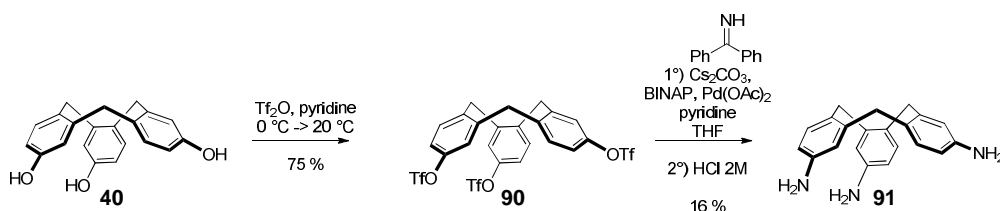


Figure 91 : schéma de synthèse du CTV **91**

### b) Synthèse des CTV trialdéhyde

Les CTV trialdéhyde sont obtenus en deux étapes à partir du cyclotriphénolène **40** et du CTV **1** (Figure 92). Dans les deux cas, la première étape consiste en une alkylation des phénols libres avec le bromoacétaldéhyde diéthylacétal pour donner les produits **92** et **94** avec des rendements de 66 et 64 % respectivement. La réaction se fait rapidement et les composés sont isolés après purification par chromatographie. Puis les diéthylacétals sont déprotégés en aldéhyde en milieu acide avec des rendements de 81 et 69 %.

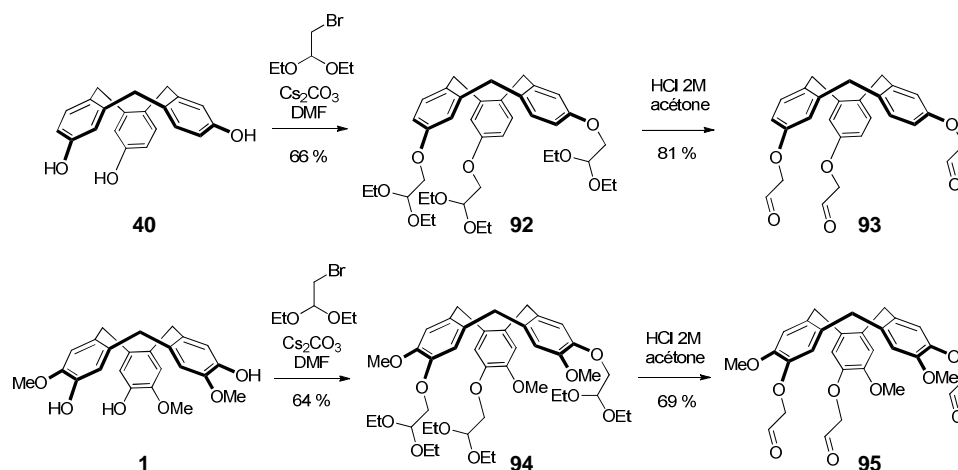
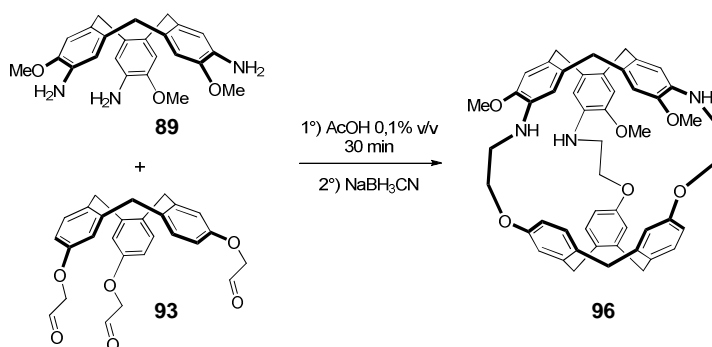


Figure 92 : schéma de synthèse des CTV trialdéhydes **93** et **95**

### c) Couplage final



Entrée	Solvant	Température	Concentration	Quantité	Observations
1	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	25 °C	7,5 mM	0	Produits de départ
2	DMSO	25 °C	7,5 mM	traces	Produits secondaires
3	DMSO	25 °C	3,5 mM	+	Produits secondaires
4	DMSO	60 °C	3,5 mM	0	Dégradation
5	MeOH	25 °C	3,5 mM	+	Produits secondaires
6	MeOH	60 °C	3,5 mM	0	Dégradation
7	MeOH/DMSO	25 °C	3,5 mM	++	Produits secondaires

Tableau 11 : conditions de réaction pour former le cryptophaniline désiré, pour toutes les réactions, ajout de 0,1 % v/v d'acide acétique en tant que catalyseur et ajout de 10 équivalents de NaBH<sub>3</sub>CN en tant que donneur d'hydrure après 30 min d'agitation

Par manque de temps, nous n'avons pu travailler que sur la synthèse du cryptophaniline **96** par réaction du CTV trianiline **89** avec le CTV trialdéhyde **93**. Différentes conditions ont été testées pour cette réaction. La formation du produit majoritaire est observée à température ambiante dans un mélange de solvant DMSO/MeOH. Il est obtenu pur après une purification par chromatographie sur silice avec un rendement de 2,7 %. Le produit est difficile à isoler à cause de produits secondaires de même polarité, ce qui explique en partie le faible rendement de la réaction. Il serait intéressant de tester d'autres réducteurs, des dilutions plus fortes afin d'éviter la formation de sous-produits et d'améliorer ce rendement.

### 3. Propriétés d'encapsulation du xénon

Nous avons pu étudier l'encapsulation du xénon par le cryptophaniline **96** par RMN  $^1\text{H}$ . Pour cela, nous avons comparé les spectres RMN  $^1\text{H}$  de **96** dans le DMSO avec et sans xénon dans le tube. Des déplacements significatifs au niveau des protons semblent indiquer que le xénon est bien encapsulé au sein de la nouvelle cage. Il serait extrêmement intéressant de continuer les études en RMN  $^{129}\text{Xe}$  afin de voir la différence de déplacement chimique du xénon par rapport aux cryptophanes -A ou -222 et d'évaluer la constante d'affinité et la vitesse d'échange.

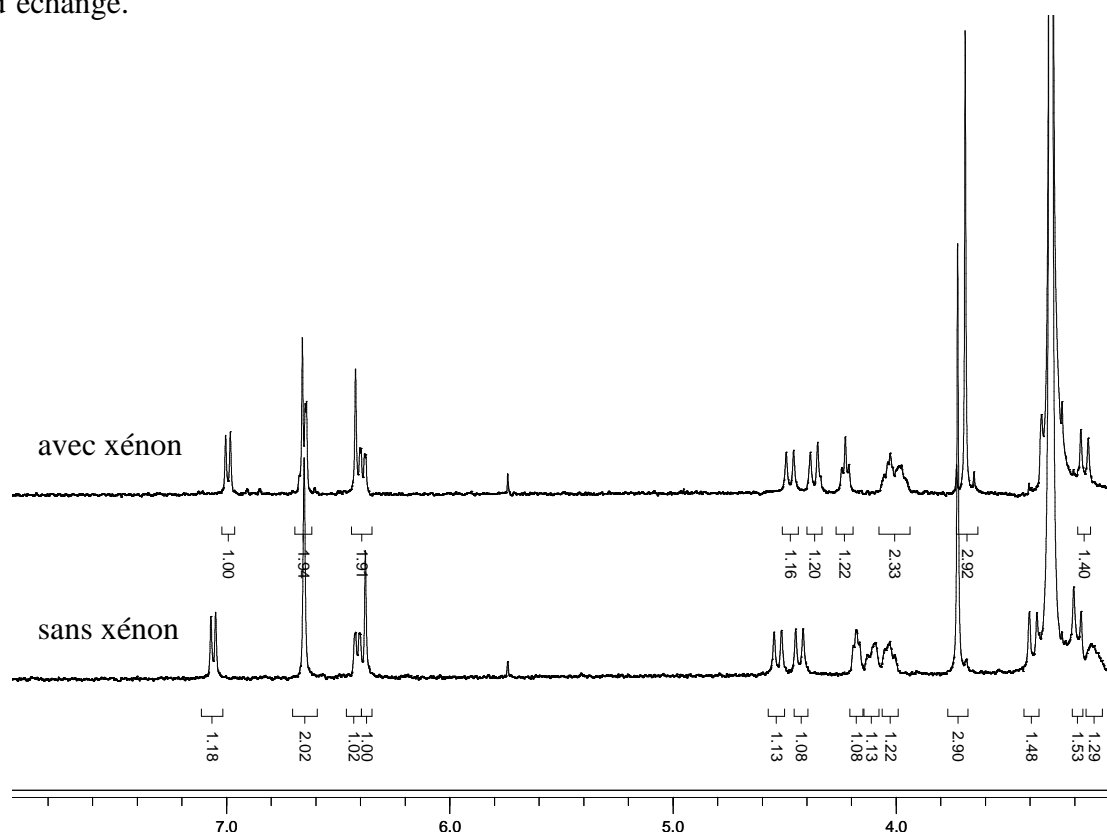


Figure 93 : spectres RMN  $^1\text{H}$  de la cryptophaniline **96** avec (haut) et sans xénon (bas)

Nous avons confirmé ensuite par RMN  $^{129}\text{Xe}$  cette encapsulation puisque l'on observe un pic caractéristique du xénon encapsulé dans la cryptophaniline à 55,2 ppm (Figure 94).

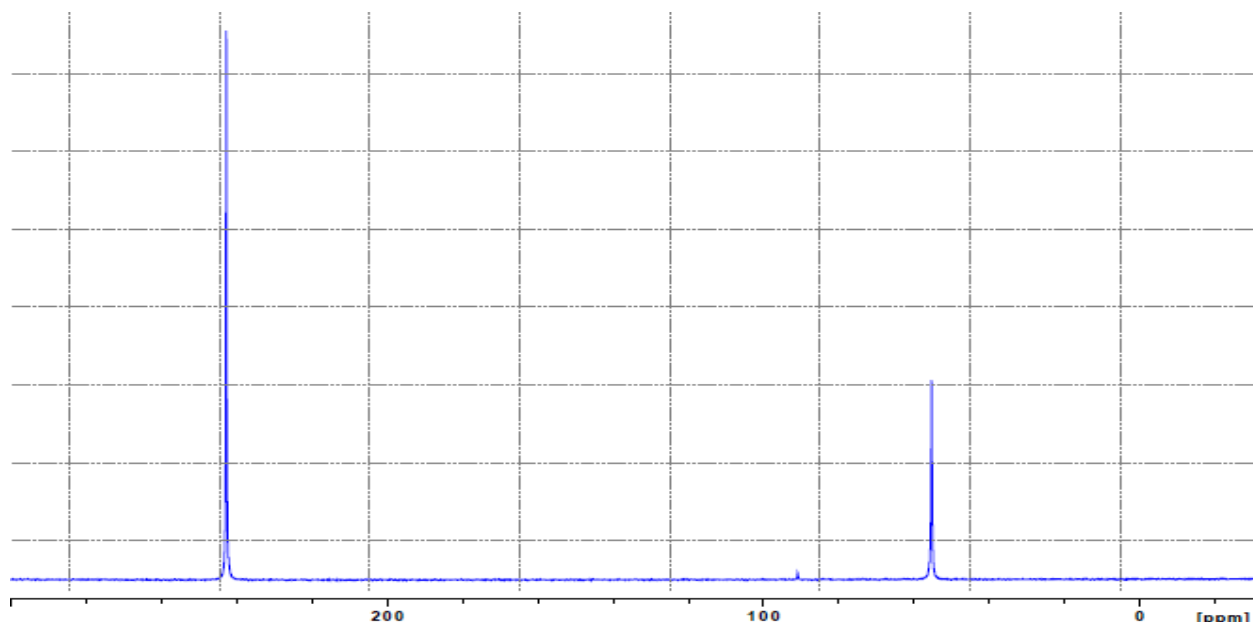


Figure 94 : spectre RMN  $^{129}\text{Xe}$  du cryptophaniline **96** (25 mM) à 293 K dans le DMSO- $\text{d}_6$

Nous avons pu comparer ce déplacement chimique à celui de l'analogue oxygéné (cryptophane C) qui dans le DMSO montre un pic beaucoup plus déblindé à 72,5 ppm. On observe ainsi déjà un effet notoire des azotes sur le déplacement chimique du xénon.

Notons qu'il s'agit tout de même de la première encapsulation du xénon dans un cryptophane aux ponts azotés.

## C. Conclusions

Dans cette partie, nous avons mis au point une nouvelle voie de synthèse qui permet d'isoler des intermédiaires ouverts et d'accéder à de nouvelles molécules cages de tailles intermédiaires : les cryptophanes -112 et -122. Ces derniers encapsulent bien le xénon et possèdent une vitesse d'échange étonnamment élevée.

Des travaux sont en cours en RMN  $^{129}\text{Xe}$  pour essayer de comprendre ce phénomène d'encapsulation inattendu qui paraît extrêmement intéressant.

Par ailleurs, une nouvelle cage aux ponts azotés a été obtenue par une stratégie nouvelle qui permet de coupler deux CTV différents en une étape. Les conditions restent à optimiser mais ce composé semble prometteur puisque la RMN  $^{129}\text{Xe}$  montre l'encapsulation du xénon avec un déplacement chimique bien spécifique.

Il serait très intéressant de décliner cette dernière stratégie à d'autres CTV pour former des cages hydrosolubles et de les fonctionnaliser au niveau des azotes.





### **III. BIOSONDE POUR LA DÉTECTION DE** **MÉTAUX**



### **III. Biosonde pour la détection de métaux**

Les métaux sont des éléments essentiels pour le développement de tous les organismes vivants. Ils jouent un rôle fondamental dans de nombreux processus biologiques. Les cellules régulent finement leur accumulation, leur transport et leur distribution. Une mauvaise homéostasie des métaux est associée à de nombreuses pathologies telles que les maladies cardiaques, le cancer ou les maladies neurodégénératives. Par exemple, de nombreuses études montrent que le zinc, le cuivre et le fer contribuent à la formation de plaques amyloïdes dans le cerveau, qui sont liées à la maladie d'Alzheimer. Une meilleure compréhension de la régulation des métaux grâce à leur visualisation par des techniques non-invasives est donc essentielle aux traitements de ces maladies.

Dans ce cadre, l'IRM  $^1\text{H}$  est une modalité attractive qui permet l'acquisition d'images anatomiques en parallèle de la détection locale de biomarqueurs. Cependant, la faible sensibilité inhérente à la RMN ne permet souvent pas d'accéder à des concentrations physiologiques. De plus, les agents de contraste qui sont utilisés cliniquement ; complexes de gadolinium ou nanoparticules d'oxydes de fer, ne sont pour l'instant pas spécifiques. Ces systèmes reposent tous sur un métal paramagnétique capable d'augmenter les vitesses de relaxation magnétiques  $1/T_1$  et  $1/T_2$  (ou relaxivité) des spins environnants. On observe en général le signal de l'eau qui peut être augmenté ou diminué aux environs de l'agent introduit, créant un contraste.

La détection sélective d'un métal repose alors sur le changement de relaxivité apporté par l'interaction de ce métal avec l'agent de contraste. Plus ce changement est important, meilleur est le contraste. La relaxivité peut être influencée par trois facteurs majeurs : le nombre de molécules d'eau coordonnées directement au métal, la vitesse d'échange de ces molécules avec l'eau environnante et le mouvement rotationnel du complexe.

Plusieurs équipes de chercheurs se sont intéressées au développement d'agents de contraste (essentiellement des complexes de gadolinium) capables de détecter sélectivement des métaux d'intérêt biologique<sup>120,121</sup> tels que le calcium, le zinc, le fer ou le cuivre. Des ligands ont été intelligemment conçus afin que l'introduction d'un métal influe sur la relaxivité (Figure 95).

Cependant, malgré leur utilité potentielle, ces systèmes restent complexes et n'ont pour l'instant pas trouvé d'applications *in vivo* du fait de leur faible sensibilité et/ou sélectivité.

---

<sup>120</sup> E. L. Que, C. J. Chang, *Chem. Soc. Rev.*, **2010**, 39, 51

<sup>121</sup> C. S. Bonnet, E. Tóth, *Future Med. Chem.*, **2010**, 2, 367

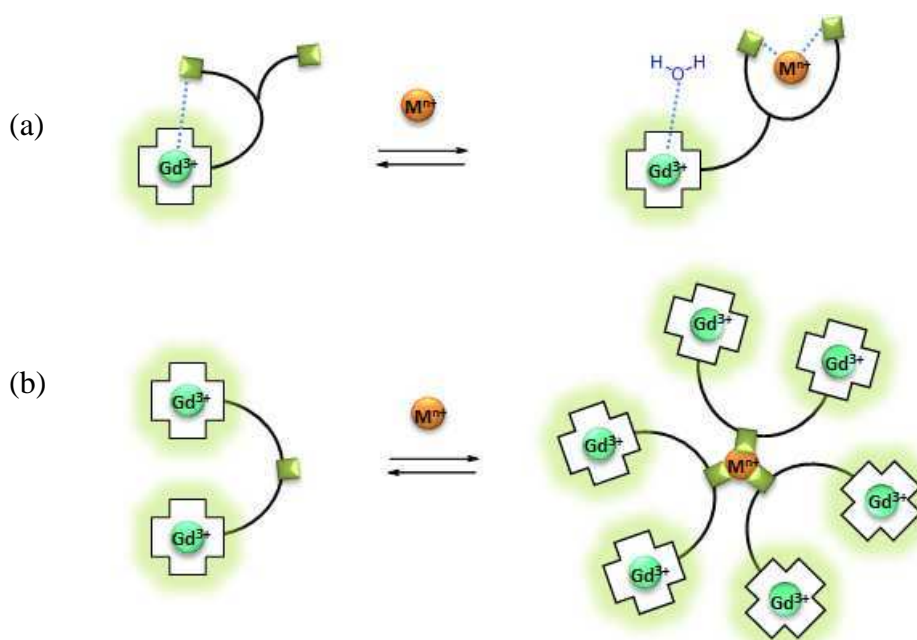
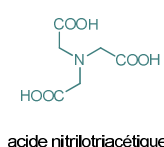


Figure 95 : stratégies les plus utilisées pour moduler la relaxivité (a) en changeant le nombre de molécules d'eau coordonnées au Gd<sup>3+</sup> (b) en changeant la taille du complexe donc son mouvement rotationnel

Nous avons pensé que l'IRM <sup>129</sup>Xe pouvait répondre à la fois au problème de sensibilité grâce à l'hyperpolarisation et à la sélectivité grâce à la large gamme de déplacements chimiques disponibles pour le xénon.

## A. Concept de la biosonde

La biosonde pour la détection de métaux doit comporter un cryptophane pour l'encapsulation du xénon et un ligand capable de chélater des métaux d'intérêt biologique. Dans notre cas, nous avons choisi comme ligand un acide nitrilotriacétique, connu pour sa grande affinité pour une large variété de dications métalliques<sup>122</sup> (Tableau 12).



Métal	Mg <sup>2+</sup>	Ca <sup>2+</sup>	Mn <sup>2+</sup>	Fe <sup>2+</sup>	Co <sup>2+</sup>	Ni <sup>2+</sup>	Cu <sup>2+</sup>	Zn <sup>2+</sup>	Pb <sup>2+</sup>
Log K	5,4	6,4	7,4	8,8	10,4	11,5	13,0	10,7	11,4

Tableau 12 : constantes d'affinité (K) de l'acide nitrilotriacétique pour divers métaux

Grâce à la grande sensibilité du xénon à son environnement chimique, on peut espérer que le déplacement chimique du xénon encapsulé varie en fonction de la présence et de la nature d'un métal chélaté par la biosonde.

<sup>122</sup> G. Anderegg, *Pure & Appl. Chem.*, **1982**, 54, 2693

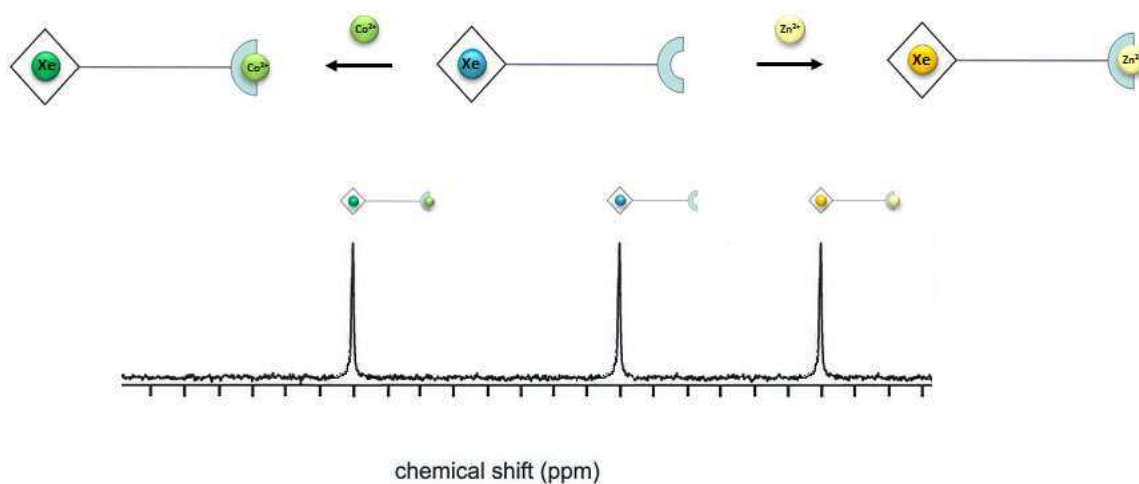


Figure 96 : concept de la biosonde à métaux : le déplacement chimique du xénon encapsulé pourrait être différent selon que le ligand est libre (xénon bleu), qu'il chélate du cobalt (xénon vert) ou qu'il chélate du zinc (xénon jaune)

## B. Synthèse

### 1. Stratégie de synthèse sur le cryptophane-111

#### a) Approche rétrosynthétique

La première stratégie de synthèse consiste à obtenir la biosonde **97** à partir du cryptophane-111. Le composé monobromé **46** peut être lithié puis carbonaté en présence de dioxyde de carbone pour donner le cryptophane **98**. Le ligand acide nitrilotriacétique peut être ensuite introduit par couplage peptidique. Nous espérons que la solubilité apportée par l'acide nitrilotriacétique sera suffisante pour tester la sonde en milieu aqueux.

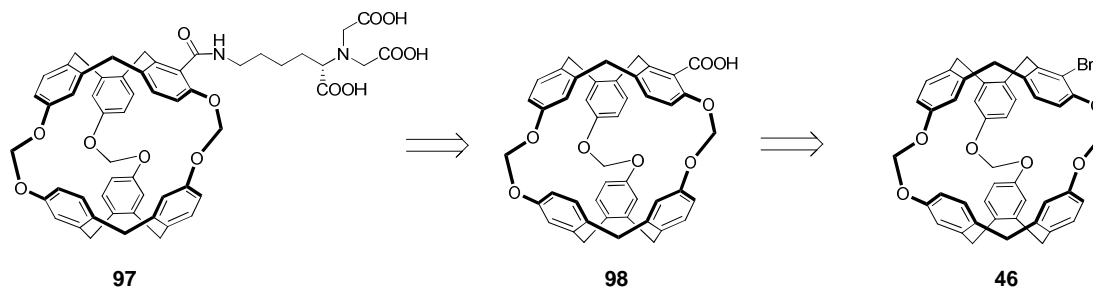


Figure 97 : schéma rétrosynthétique pour l'obtention de la biosonde **97**

### b) Synthèse de la biosonde **97**

La synthèse du cryptophane **98** a été développée par le Dr. Ténin Traoré pendant sa thèse (Figure 98). Il est obtenu par lithiation du précurseur **46** avec du n-butyllithium à  $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$  pendant 5 minutes. Ce lithien est ensuite piégé par du dioxyde de carbone à  $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$  pendant une heure puis à température ambiante pendant 2 heures. Le cryptophane **98** est isolé avec un rendement de 27 % après purification par chromatographie sur gel de silice.

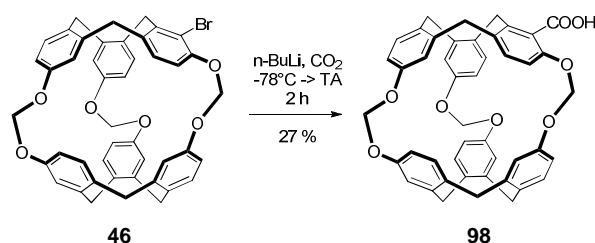


Figure 98 : schéma de synthèse de l'acide **98**

Le ligand nitrilotriacétique **103** est obtenu en trois étapes à partir de la Z-lysine commerciale (Figure 99). La procédure a été utilisée par le Dr. Julien Ogier pendant sa thèse<sup>123</sup>.

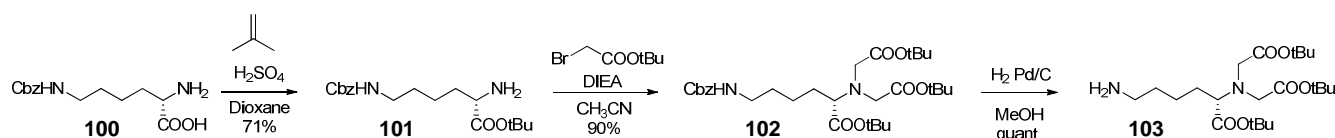


Figure 99 : schéma de synthèse du ligand protégé

L'acide carboxylique du composé **100** est d'abord protégé par de l'isobutène pour donner **101** avec un rendement de 71 %. L'amine primaire est ensuite alkylée avec du tertbutylbromoacétate. Le carbamate est clivé par hydrogénation avec du palladium sur charbon pour donner quantitativement **103**.

Après des essais non concluants de couplage entre le cryptophane **98** et l'amine **103** avec du PyBOP en présence de DIEA dans le DMSO ou avec de l'HOBt et du DCC dans le

<sup>123</sup> J. Ogier, Thèse de doctorat en chimie organique de l'Université Paris Sud

dichlorométhane, nous avons réussi à obtenir le cryptophane **104** souhaité à partir de l'ester activé NHS (Figure 100).

Le composé **98** est activé avec un léger excès de NHS et d'EDCI dans du dichlorométhane anhydre pour conduire à l'ester activé **99** avec un rendement de 95 % après purification sur gel de silice. La synthèse du composé **99** a déjà été décrite par le Dr. Léa Delacour dans sa thèse. L'ester activé **99** en présence d'un excès d'amine **103** donne le cryptophane fonctionnalisé **104**.

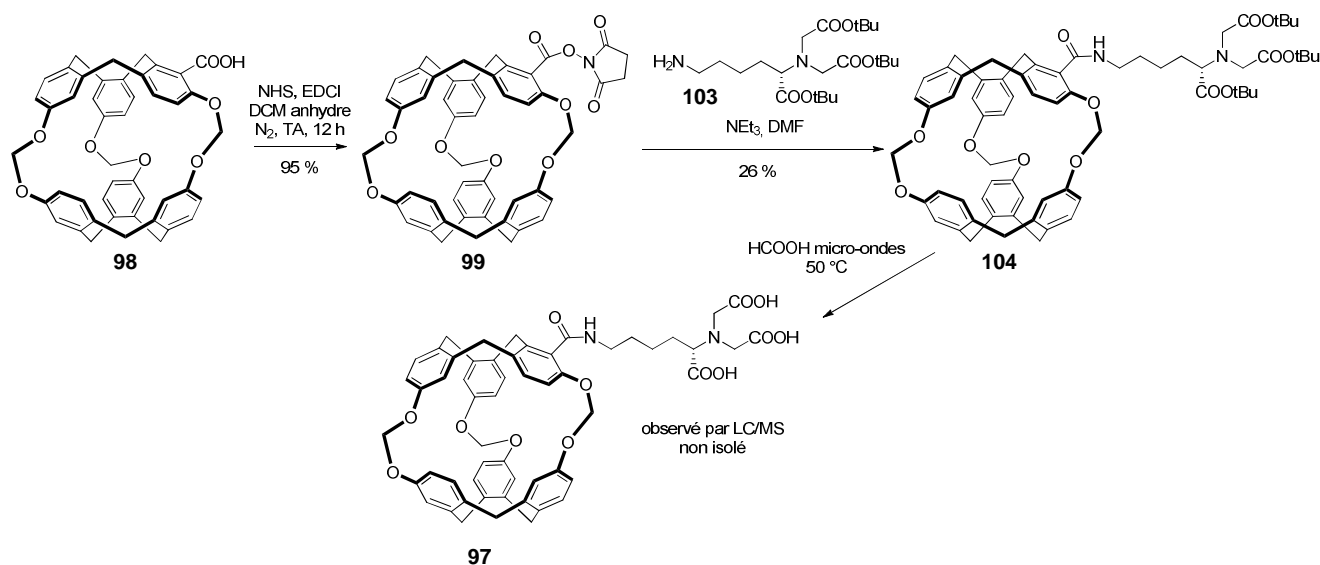


Figure 100 : schéma de synthèse de la biosonde **97**

Plusieurs conditions ont été testées pour déprotéger les esters de terbutyle du ligand sans cliver les ponts acétals du cryptophane en milieu acide. Le composé désiré est majoritairement observé par LC/MS après 2 h au four à micro-ondes à 50 °C dans l'acide formique. Cependant, les pics caractéristiques du cryptophane n'ont jamais pu être observés par RMN <sup>1</sup>H dans D<sub>2</sub>O, et ce quelque soit le pH. Le composé est par contre soluble dans l'acétonitrile. Ce résultat démontre la très faible solubilité aqueuse de **97**. Un tel composé est donc difficilement utilisable pour l'imagerie des cations. À ce stade, au vu des problèmes de solubilité et des difficultés de purification du composé **97**, nous avons décidé d'envisager une autre stratégie de synthèse à partir du cryptophane **35** hydrosoluble.

### 3. Stratégie de synthèse avec un cryptophane-222 hydrosoluble

Afin de résoudre le problème de solubilité aqueuse, nous avons envisagé d'utiliser le cryptophane-222 hexacarboxylate **35** (Figure 101). Ce composé a été synthétisé pour la

première fois par l'équipe de Collet<sup>75</sup> et a été utilisé comme sonde à pH par Brotin et Dutasta en collaboration avec Berthault<sup>76</sup>. Si l'utilisation de ce cryptophane peut permettre de résoudre le problème de solubilité aqueuse, elle présente cependant deux risques :

- Le xénon ayant une plus faible affinité pour un cryptophane-222 que pour un cryptophane-111, l'influence de la présence d'un cation métallique sur le déplacement chimique pourrait être plus faible voire inexistante.
- Aucune méthode de monofonctionnalisation de ce cryptophane n'étant décrite dans la littérature, la synthèse pourrait s'avérer complexe.

#### a) Approche rétrosynthétique

Cette approche vise à monoactiver le cryptophane **35** afin de fixer directement le ligand nitrilotriacétique déprotégé.

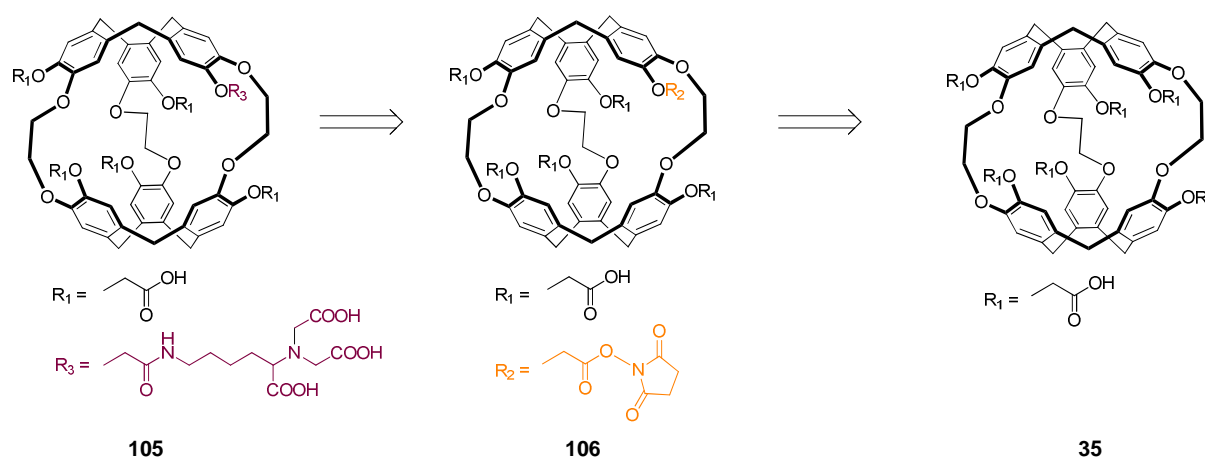


Figure 101 : schéma de rétrosynthèse de la biosonde **105**

#### b) Synthèse du cryptophane **35**

Le schéma de synthèse du cryptophane **35** est rappelé dans la Figure 102. La fonction phénol de l'alcool vanillique **2** est d'abord protégée par le bromure d'allyle pour donner **3**. Ce dernier est cyclotrimérisé en milieu acide. Puis le CTV **4** est déallylé pour donner le CTV **1** que l'on alkyle pour obtenir **36**. La cage étant déjà préformée, la cyclotrimérisation intramoléculaire a lieu en milieu dilué avec un rendement de 70 %. Enfin, le cryptophane-A est déméthylé avec du  $\text{PPh}_2\text{Li}$  et alkylé par du bromoacétate de méthyle **37**. Le composé est ensuite saponifié pour donner le cryptophane **35**.



Ce cryptophane nous a été fourni par le Dr. Thierry Brotin de l'ENS Lyon.

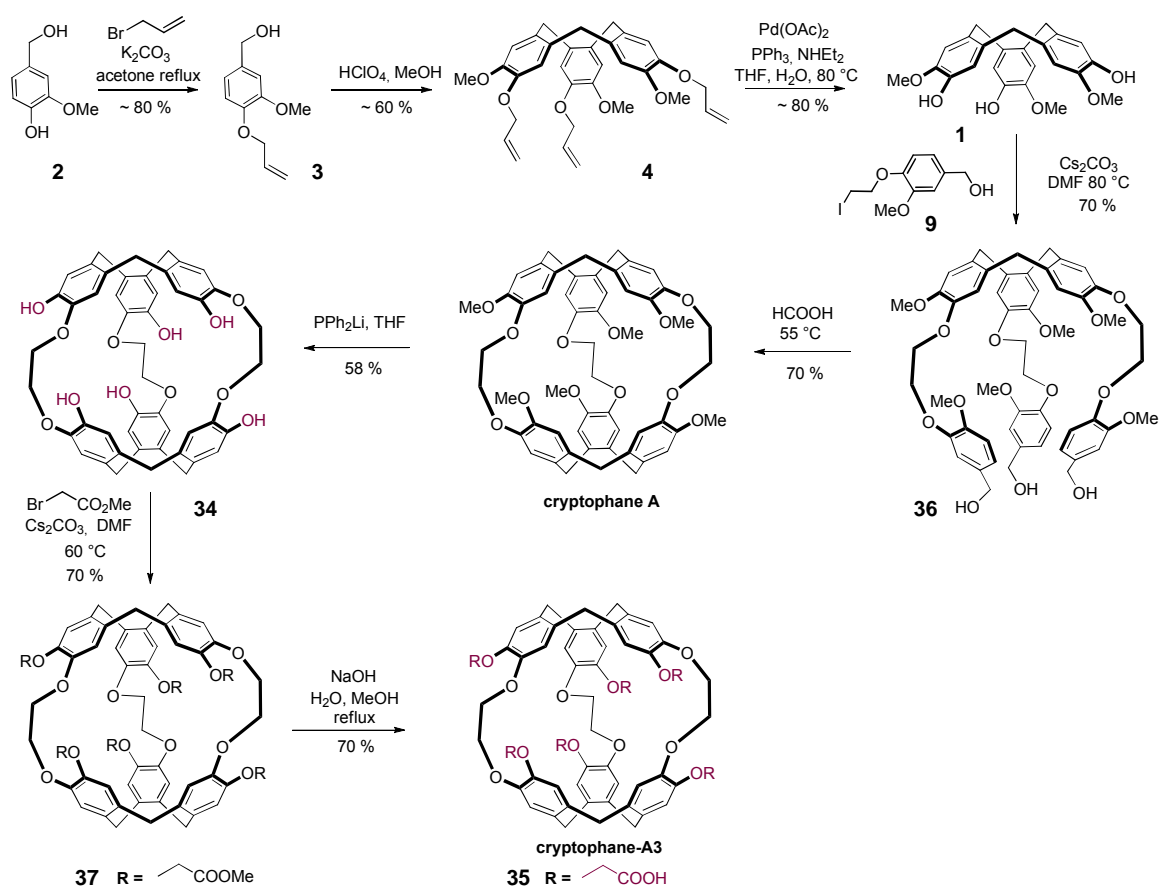


Figure 102 : synthèse du cryptophane 35

### c) Synthèse de la biosonde 105

Le ligand déprotégé (L)-107 est obtenu en une étape à partir de 103 (Figure 103).

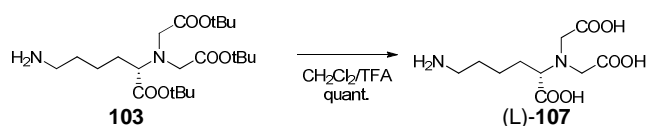


Figure 103 : déprotection de 103

Plusieurs agents de couplage ont été ensuite testés afin de coupler le cryptophane 35 au ligand 107. Des traces de sonde finale n'ont été observées qu'en présence de NHS et d'EDCI. Nous avons donc décidé de contrôler la formation de l'ester activé avec ces agents. L'activation du

cryptophane par 1,0 équivalent de NHS et 1,1 équivalents d'EDCI conduit à la formation majoritaire du composé monoester activé **106** en 5 h. Cependant, on observe toujours du produit de départ **35** et les cryptophanes **108** et **109** où respectivement 2 et 3 fonctions acide carboxylique ont été activées (Figure 104). On suit cette réaction par LC/MS.

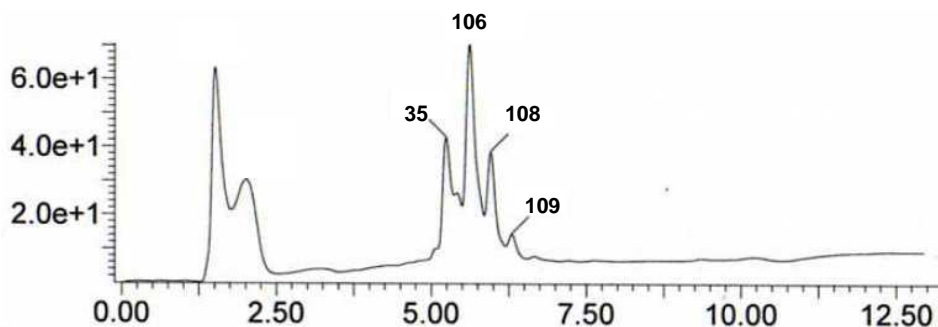


Figure 104 : profil LC de l'étape de monoactivation de **35** au bout de 5 h

Cette réaction a d'abord été conduite dans le DMF. Cependant, le traitement de cette réaction par extraction ou par évaporation directe du DMF conduit à la dégradation et la perte des produits désirés. Nous avons donc décidé de faire cette réaction dans le DMSO afin de pouvoir injecter directement le milieu réactionnel sur HPLC pour purification.

L'amine (L)-**107** solubilisée dans du DMSO et la TEA sont donc ajoutées dans le milieu réactionnel contenant majoritairement du cryptophane monoester activé **106**. La réaction est laissée sous agitation à température ambiante 12 h. On observe la formation du produit attendu **105** (cryptophane comportant un groupement nitrilotriacétique) et du cryptophane **35**. On détecte également des traces de cryptophane **110** comportant deux ligands nitrilotriacétique (Figure 105).

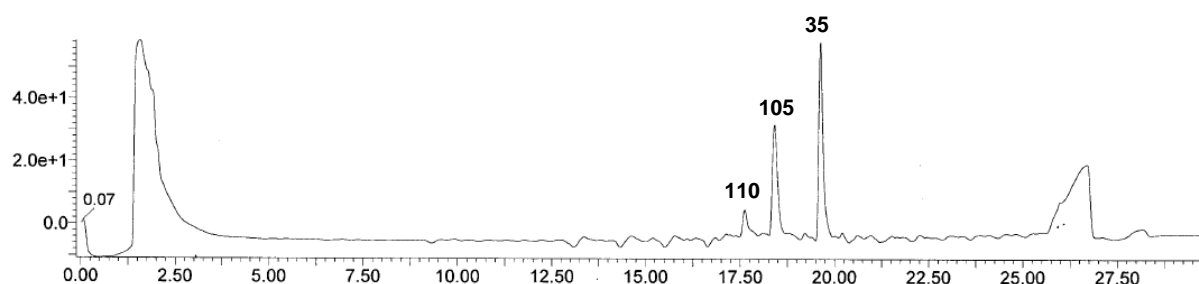


Figure 105 : profil LC du brut réactionnel

La biosonde **105** est isolée avec 12 % de rendement après une chromatographie en phase inverse (Figure 106). Le cryptophane étant racémique et le ligand nitrilotriacétique énantiopure, on isole en fait un mélange de deux diastéréoisomères non séparables dans les conditions chromatographiques utilisés.

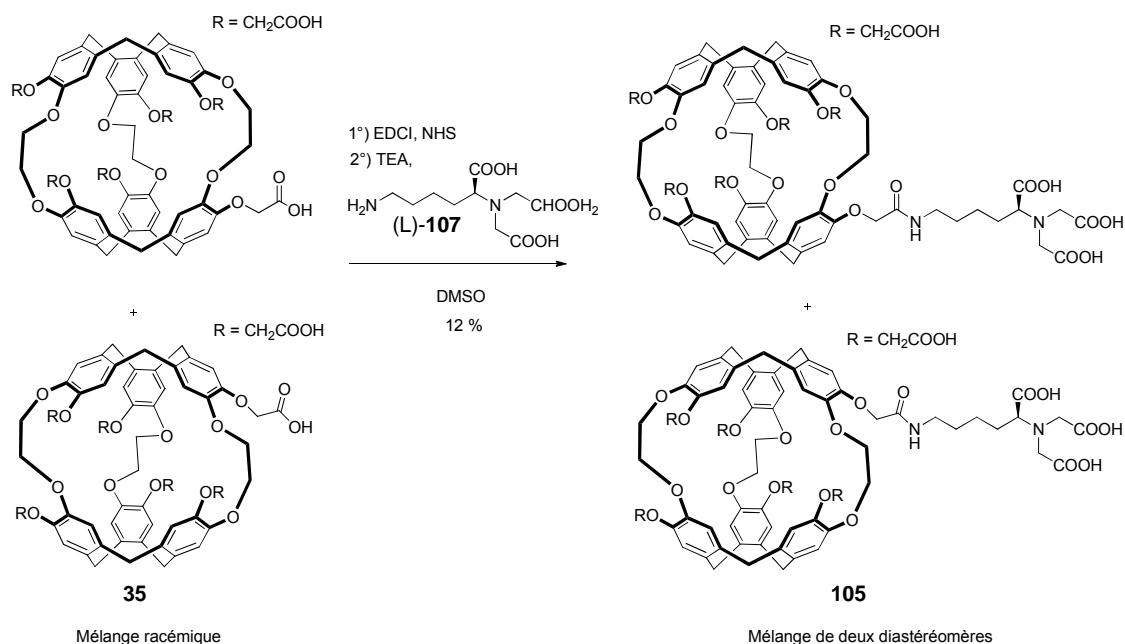


Figure 106 : synthèse de la biosonde **105**

#### d) Synthèse des diastéréoisomères **105a** et **105b**

Suite aux premiers tests RMN <sup>129</sup>Xe extrêmement encourageants qui seront décrits en partie C.1.a), nous avons voulu isoler chacun des diastéréoisomères. Pour cela, nous avons couplé le ligand nitrilotriacétique sur les cryptophanes énantiopurs PP-**35** et MM-**35**. Les cryptophanes énantiopurs ont été fournis par le Dr. Thierry Brotin qui a mis au point la procédure de résolution optique<sup>70</sup> (Figure 107).

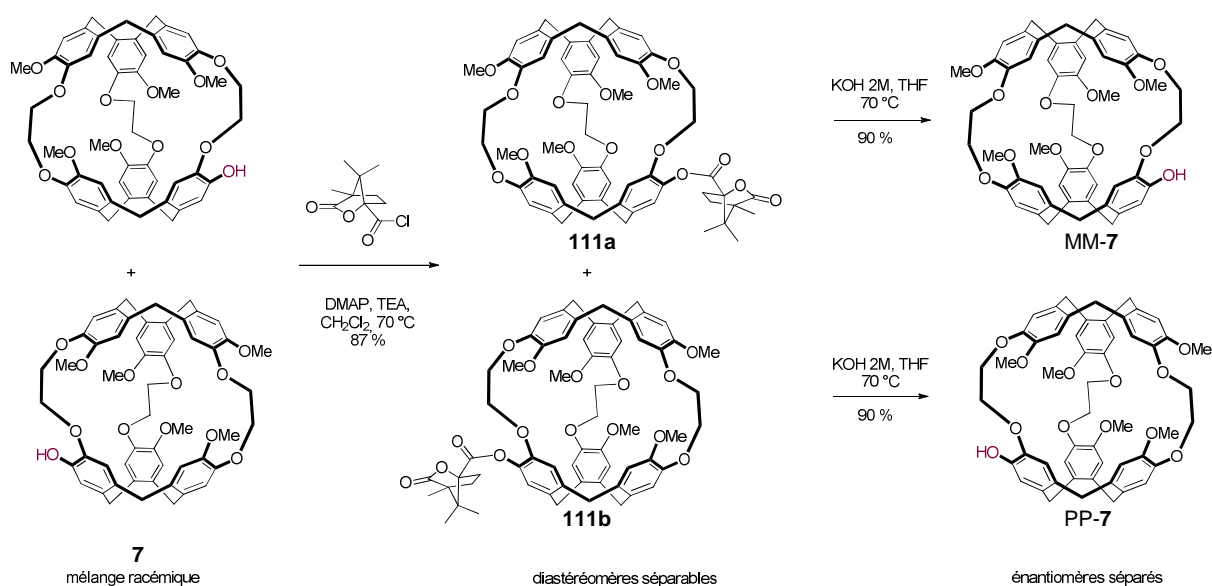


Figure 107 : résolution optique du cryptophane **7**

Cette séparation se fait par introduction d'une copule chirale sur le cryptophane **7** dont la synthèse a été décrite (Figure 45 et Figure 69). Les deux diastéréoisomères **111a** et **111b** obtenus sont séparés par cristallisations successives. Puis l'élément chirale est clivé en conditions basiques. Les cryptophanes PP-**7** et MM-**7** conduisent aux cryptophanes PP-**34** et MM-**34** après déméthylation avec du  $\text{PPh}_2\text{Li}$ . Les deux étapes suivantes pour conduire aux composés PP-**35** et MM-**35** se font dans les mêmes conditions que pour le mélange racémique (Figure 102).

Les mono esters activés **106a** et **106b** sont ensuite obtenus par la méthode précédente sur les cryptophanes PP-**35** et MM-**35**. Puis l'ajout du ligand déprotégé (L)-**107** conduit respectivement aux diastéréoisomères **105a** et **105b** avec des rendements de 12 et 16 % après purification HPLC (Figure 108).

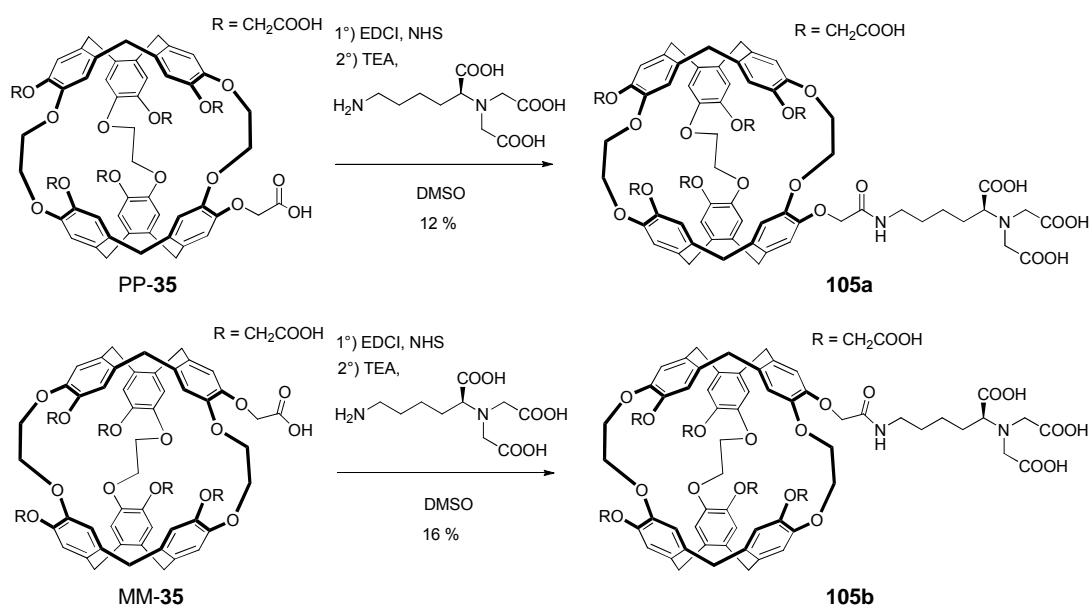


Figure 108 : synthèse des diastéréoisomères **105a** et **105b**

## C. Résultats en RMN <sup>129</sup>Xe

Toutes les expériences de caractérisations qui suivent ont été faites par le Dr. Patrick Berthault et son équipe au Laboratoire de Structure et Dynamique par Résonance Magnétique (LSDRM) au CEA à Saclay.

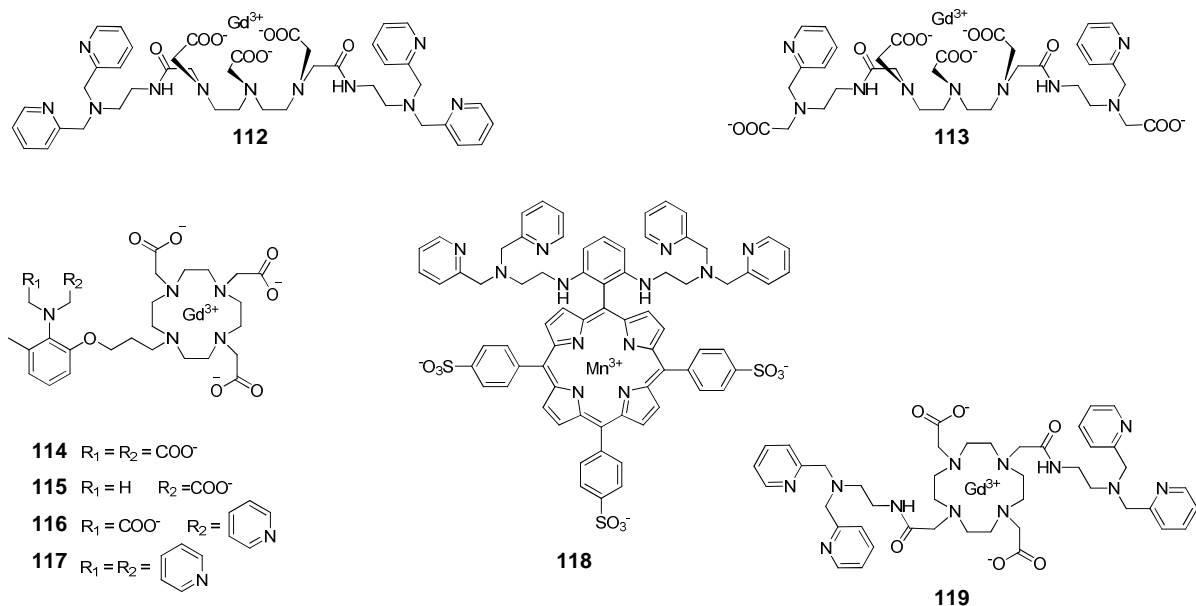
## 1. Biosonde à zinc

Le zinc est le second métal le plus abondant dans le corps humain après le fer, avec entre 2 et 4 g distribués dans l'organisme. Il se trouve en général au sein de métalloprotéines et participe au fonctionnement de plus de 300 protéines essentielles à nos cellules. Le zinc est un bon acide de Lewis, ce qui en fait un agent catalytique dans les hydroxylations ainsi que dans d'autres réactions enzymatiques. Il a une géométrie de coordination flexible qui permet aux protéines de changer rapidement de conformation. Le zinc existe également sous forme libre. Au sein des cellules, sa concentration est très faible : de l'ordre de quelques centaines de picomolaires. Dans le plasma humain, elle est reportée à 8  $\mu\text{M}$ . C'est le cerveau qui contient les concentrations les plus élevées, avec près de 300  $\mu\text{M}$  dans les vésicules de certains types de cellules glutamatergiques neuronales.

Plusieurs pathologies sont liées à des dérèglements du métabolisme du zinc. Par exemple, de fortes concentrations en zinc sont impliquées dans les crises épileptiques ou les traumatismes crâniens. Le zinc contribue également à la formation de plaques amyloïdes qui sont associées à la maladie d'Alzheimer. Des concentrations de zinc trop faibles sont liées à l'insuffisance rénale chronique.

Il existe plusieurs agents de contraste qui permettent aujourd'hui de visualiser le zinc par imagerie par résonance magnétique. Ils reposent tous sur un métal paramagnétique capable d'augmenter les vitesses de relaxation magnétiques  $1/T_1$  et  $1/T_2$  (ou relaxivité) des protons des molécules d'eau. La détection d'un métal par un agent repose sur le changement de relaxivité apporté par la chélation de ce métal. Plus cette différence est importante, meilleur sera le contraste. Quelques propriétés pertinentes et les structures des agents les plus prometteurs sont présentées en Tableau 13.

La limite de détection actuelle de ces composés est de 30  $\mu\text{M}$  alors que les concentrations physiologiques du zinc sont souvent bien inférieures. Nous avons donc pensé que la technique d'imagerie par résonance magnétique du xénon hyperpolarisé pouvait pallier ce problème de sensibilité.



Composé	Changement maximal en relaxivité (%)	Milieu d'étude	Sélectif vis-à-vis de	Référence
<b>112</b>	-35 <sup>a</sup>	Tampon Tris pH=8, 25 °C	$\text{Ca}^{2+}$ $\text{Mg}^{2+}$	124
<b>113</b>	-30 <sup>a</sup>	Tampon KMOPS pH=7,2 25 °C	$\text{Na}^+$ $\text{K}^+$ $\text{Ca}^{2+}$ $\text{Mg}^{2+}$	125
<b>114</b>	+73 <sup>b</sup> +33 <sup>b</sup>	Tampon HEPES pH=7,4 37 °C	$\text{Ca}^{2+}$ $\text{Mg}^{2+}$	126
<b>115</b>	+2,4 <sup>b</sup>	Tampon HEPES pH=7,4 37 °C		127
<b>116</b>	+103 <sup>b</sup>	Tampon HEPES pH=7,4 37 °C		127
<b>117</b>	-4 <sup>b</sup>	Tampon HEPES pH=7,4 37 °C		127
<b>118</b>	-24 <sup>c</sup> -84 <sup>d</sup>	Tampon PIPES	$\text{Na}^+$ $\text{K}^+$ $\text{Ca}^{2+}$ $\text{Mg}^{2+}$	128
<b>119</b>	+165 <sup>d</sup> +40 <sup>d</sup>	Tampon Tris + HSA pH=7,6 37 °C	$\text{Ca}^{2+}$ $\text{Mg}^{2+}$	129

Tableau 13 : structure et propriétés d'agents de contraste pour la détection du zinc (a) mesuré à 300 MHz (b) mesuré à 60 MHz (c) mesuré à 200 MHz (d) pourcentage de changement en  $T_1$

<sup>124</sup> K. Hanaoka, K. Kikuchi, Y. Urano, M. Narazaki, T. Yokawa, S. Sakamoto, K. Yamaguchi, T. Nagano, *Chem. Biol.* **2002**, 9, 1027

<sup>125</sup> J. L. Major, G. Parigi, C. Luchinat, T. J. Meade, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, 104, 13881

<sup>126</sup> A. C. Esqueda, J. A. Lopez, G. Andreu-de-Riquer, J. C. Alvarado-Monzon, J. Ratnakar, A. J. M. Lubag, A. D. Sherry, L. M. De Leon-Rodriguez, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131, 11387

<sup>127</sup> J. L. Major, R. M. Boiteau, T. J. Meade, *Inorg. Chem.* **2008**, 47, 10788

<sup>128</sup> X. A. Zhang, K. S. Lovejoy, A. Jasanoff, S. J. Lippard, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, 104, 10780

<sup>129</sup> R. Trokowski, J. Ren, F. K. Kálmán, A. D. Sherry, *Angew. Chem.* **2005**, 117, 7080 ; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 6920

#### a) Test sur le mélange des deux diastéréoisomères

On estime que la constante d'affinité de cette biosonde pour le xénon est du même ordre de grandeur que pour le cryptophane **35** (autour de  $6000 \text{ M}^{-1}$ ). Ce dernier étant connu comme sonde à pH, les expériences ont été menées à  $\text{pH} = 7,4$  dans un tampon phosphate. En l'absence de zinc, le spectre RMN  $^{129}\text{Xe}$  du mélange des deux isomères présente deux signaux : le pic du xénon libre dans l'eau à 196 ppm et le pic du xénon encapsulé dans la biosonde **105** à 65,6 ppm (seule la région du xénon encapsulé est présentée en Figure 109). Les deux diastéréoisomères ne sont donc pas différenciés par RMN  $^{129}\text{Xe}$ . L'ajout progressif du cation métallique fait décroître ce signal à 65,6 ppm et croître deux nouveaux pics à 65,75 et 67,2 ppm. Nous avons émis l'hypothèse que ces deux signaux correspondaient aux deux diastéréoisomères chélatant le cation. La complexation du zinc par la biosonde nitrilotriacétique réduirait la flexibilité du bras espaceur et permettrait au xénon de différencier les deux isomères.

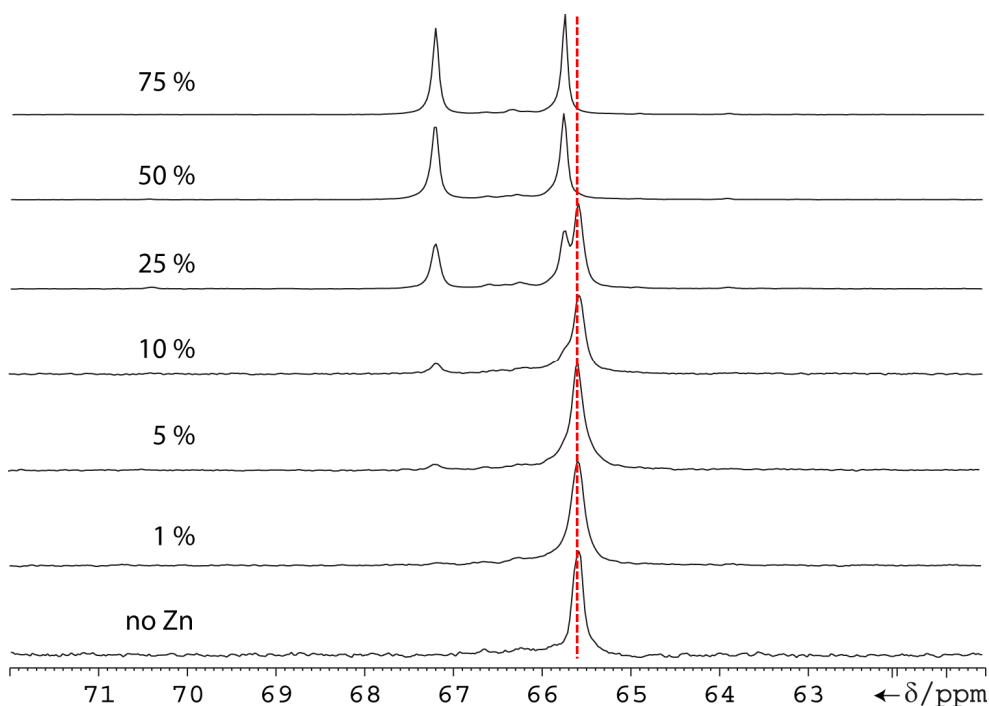


Figure 109 : spectres RMN  $^{129}\text{Xe}$  de la biosonde **105** ( $260 \mu\text{M}$ ) en l'absence et en présence de zinc

### b) Test sur les diastéréoisomères séparés

Afin de confirmer cette hypothèse, nous avons synthétisé chacun des deux diastéréoisomères et nous avons saturé chacune des sondes en zinc. Les cryptophane **105a** et **105b** donnent alors un seul signal à respectivement 65,75 et 67,2 ppm en RMN  $^{129}\text{Xe}$  (Figure 110).

Ces expériences confirment bien notre hypothèse et permettent d'identifier le composé dont le signal est le plus éloigné du signal de la biosonde seule. Ce composé, le cryptophane **105b** semble donc le plus intéressant *in vitro*.

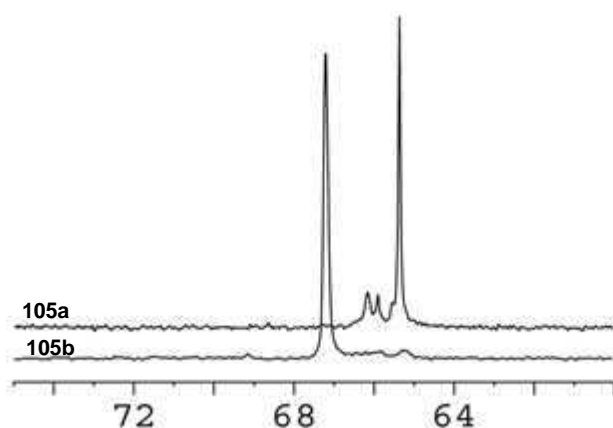


Figure 110 : spectres RMN  $^{129}\text{Xe}$  des diastéréoisomères **105a** (haut) et **105b** (bas) saturés de zinc

Le signal sature après ajout de 0,5 équivalent de zinc par rapport à la sonde. Ce qui semble indiquer la formation de dimères où deux biosondes chélatent un cation  $\text{Zn}^{2+}$ . Ce résultat a été confirmé par des expériences de RMN de diffusion.

La présence de dimères doit en fait engendrer trois isomères en solution qui peuvent être notés :  $[\text{Zn}(\mathbf{105a} \mathbf{105a})]$ ,  $[\text{Zn}(\mathbf{105b} \mathbf{105b})]$  et  $[\text{Zn}(\mathbf{105a} \mathbf{105b})]$ . Or, nous ne voyons que deux signaux en RMN  $^{129}\text{Xe}$ . Cela semble indiquer que le xénon encapsulé ne détecte pas la configuration du second cryptophane participant à la complexation du zinc.

### c) Limite de détection

La limite de détection a ensuite été déterminée par des expériences de RMN  $^{129}\text{Xe}$ . On peut détecter jusqu'à 100 nM en zinc, soit 300 fois moins qu'avec les méthodes publiées jusqu'à présent avec les différents agents de contraste. De plus, nous pensons qu'il serait possible



d'améliorer cette sensibilité en utilisant des séquences de pulse plus sophistiqués du type HYPER-CEST.

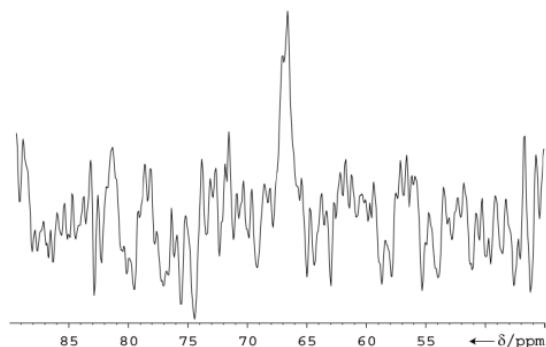


Figure 111 : pic détecté de biosonde **105b** (194 nM) chélatant le zinc à 100 nM de zinc

#### d) Spécificité

Nous avons aussi vérifié la spécificité de cette sonde au zinc. D'autres cations d'intérêt biologique comparable ont été testés dans les mêmes conditions. Cependant, ni le calcium, ni le magnésium n'engendre de différence de déplacements chimiques sur les spectres RMN <sup>129</sup>Xe. Un tel résultat peut être expliqué par les affinités bien plus faibles du ligand nitrilotriacétique pour ces métaux (Tableau 12).

#### e) Images

Vu la finesse des pics, la différence de 1,7 ppm entre les signaux du xénon en l'absence et en présence de Zn<sup>2+</sup> est largement suffisante pour faire de l'IRM. Des premières images en IRM <sup>129</sup>Xe ont pu être obtenues à partir de tubes RMN contenant une solution de biosonde en présence de calcium ou de zinc (Figure 112). Ces images montrent qu'il est possible de détecter spécifiquement les cations Zn<sup>2+</sup> à de faibles concentrations en peu de temps.

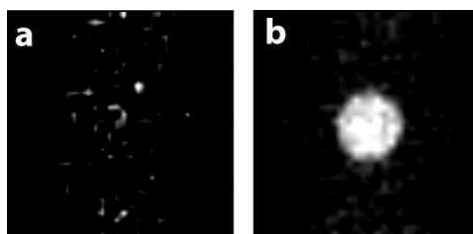


Figure 112 : IRM <sup>129</sup>Xe de tubes RMN contenant 200 μM de biosonde **105** (mélange des deux diastéréoisomères) (a) avec 150 μM de calcium (b) avec 100 μM de zinc

## 2. Biosonde à métaux

Les applications de cette sonde ne se limitent en fait pas au zinc. Si le calcium et le magnésium ne provoquent pas de changements suffisants dans l'environnement électronique pour induire une différence de déplacement chimique du xénon encapsulé, d'autres métaux tels que le cobalt, le cadmium ou le plomb donnent au xénon une signature spécifique. De tels résultats sont extrêmement prometteurs.

L'équipe de Patrick Berthault étudie actuellement la possibilité de détecter plusieurs métaux grâce à cette biosonde par RMN  $^{129}\text{Xe}$ .

## D. Conclusions

Nous avons conçu et synthétisé une biosonde pour la détection de métaux extrêmement sensible qui permet de visualiser jusqu'à 100 nM en zinc. Ce résultat a été récemment publié<sup>130</sup>.

Pour cela, nous avons développé une stratégie de monoactivation du cryptophane **35**. Nous avons isolé les diastéréoisomères **105a** et **105b** et mis en évidence l'importance de travailler avec des cryptophanes énantio-pures.

La biosonde **105b** obtenue donne une signature spécifique au xénon encapsulé lorsqu'elle chélate du zinc avec une différence de déplacement chimique de 1,7 ppm comparé au xénon encapsulé dans la biosonde en l'absence de métaux. Les expériences de diffusion ont montré que deux biosondes sont complexées à un cation zinc.

L'utilisation du xénon hyperpolarisé a donc permis de détecter des concentrations 300 fois inférieures à ce qui a été décrit avec les meilleurs agents de contrastes par des méthodes d'IRM classiques.

Cette sonde permet également de détecter d'autres cations d'intérêt puisque le déplacement chimique du xénon encapsulé au sein de la biosonde varie en présence de  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  par exemple.

---

<sup>130</sup> N. Kotera, N. Tassali, E. Léonce, C. Boutin, P. Berthault, T. Brotin, J.-P. Dutasta, L. Delacour, T. Traoré, D.-A. Buisson, F. Taran, S. Coudert, B. Rousseau, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, 17, 4100

#### **IV. BIOSONDE BIMODALE IRM $^{129}\text{Xe}$ ET** **IRM $^1\text{H}$**



## **IV. Biosonde bimodale IRM $^{129}\text{Xe}$ et IRM $^1\text{H}$**

Nous l'avons mentionné en introduction, les techniques d'imagerie sont en général complémentaires. L'utilisation de plusieurs modalités est souvent nécessaire pour avoir les informations anatomiques et fonctionnelles suffisantes pour faire un diagnostic précis et efficace. L'imagerie multimodale allie les avantages de chacune des méthodes mises en jeu. Cette partie aborde la synthèse d'une sonde bimodale IRM  $^{129}\text{Xe}$  et  $^1\text{H}$  qui permettrait la colocalisation d'une molécule unique avec un seul appareillage.

### **A. Agents de contraste CEST et PARACEST en IRM $^1\text{H}$**

Au premier abord, IRM  $^{129}\text{Xe}$  et  $^1\text{H}$  semblent peu compatibles. Les agents de contraste classiquement utilisés en IRM  $^1\text{H}$  comportent des métaux paramagnétiques capables de créer de fortes perturbations locales de champs magnétiques qui diminuent les temps de relaxation des spins environnants. On observe en général le signal de l'eau qui peut être augmenté ou diminué aux environs de l'agent introduit, créant un contraste. Si de tels agents étaient placés à proximité d'une biosonde encapsulant du xénon hyperpolarisé, ils provoqueraient une relaxation rapide du xénon, ce qui conduirait à la diminution voire la perte de son signal. Ainsi, les complexes de gadolinium, de manganèse ou les nanoparticules d'oxyde de fer ne peuvent pas être utilisés pour concevoir une biosonde bimodale IRM  $^{129}\text{Xe}$ /IRM  $^1\text{H}$ .

Pour pouvoir coupler les deux modalités, nous allons utiliser un autre type d'agent de contraste IRM : les agents CEST (pour *Chemical Exchange Saturation Transfer*). Il s'agit d'exploiter l'existence d'un échange chimique entre les protons de l'eau (forme A) et des protons de la biosonde (forme B) (Figure 113)<sup>131,132</sup>. L'envoi d'une impulsion longue à la fréquence de résonance des protons de la biosonde provoque la relaxation rapide de ces protons et donc la disparition du signal RMN. Or, ces protons étant en échange permanent avec les protons de l'eau environnante, le signal de l'eau va également décroître.

Il y a plusieurs conditions pour que système soit efficace. Il faut que les deux entités en échange soient en échange lent à l'échelle de la RMN. Plus la différence de déplacement chimique entre l'eau et les protons échangeables de la biosonde est grande, plus il sera facile

<sup>131</sup> S. Aime, C. Carrera, D. Delli Castelli, S. Geninatti Crich, E. Terreno, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2005**, *44*, 1813

<sup>132</sup> M. Woods, D. E. Woessner, A. D. Sherry, *Chem. Soc. Rev.*, **2006**, *35*, 500

de sélectivement saturer le signal. Cependant, il faut aussi que la vitesse d'échange soit suffisamment grande pour transférer la saturation le plus rapidement possible.

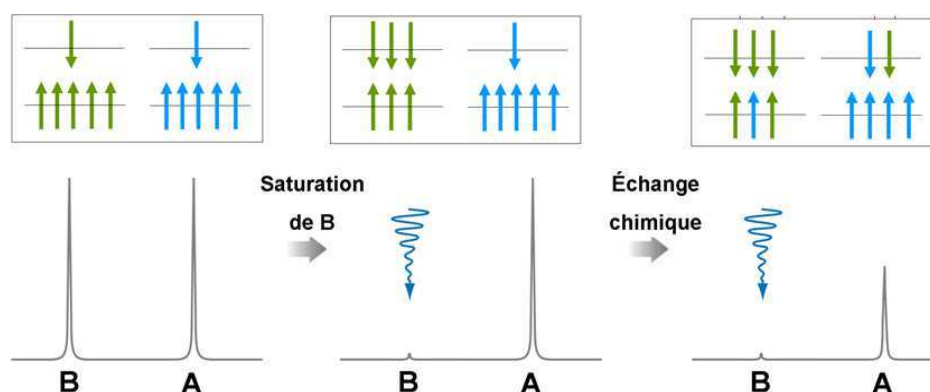


Figure 113 : concept du CEST

Ces conditions sont remplies pour un certain nombre de composés comportant des sites de protons échangeables (-NH, -OH ou H<sub>2</sub>O) dont la fréquence de résonance est particulièrement éloignée de celle de l'eau.

C'est par exemple le cas de dérivés tétraamides de DOTA complexant de l'euprium (Figure 114)<sup>133</sup>. En effet, l'eau coordonnée à l'euprium est en échange lent avec l'eau environnante et possède un signal dont le déplacement chimique est à plus de 50 ppm du signal de l'eau libre. Une telle différence provient des propriétés paramagnétiques du métal et permet un contraste important par transfert de saturation. De manière générale, ces systèmes exploitant des métaux paramagnétiques complexés sont appelés des agents PARACEST.

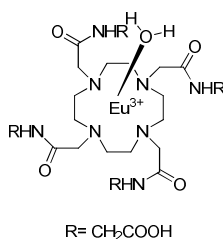


Figure 114 : exemple d'agent PARACEST

Ces composés ne sont pas utilisés pour leur capacité à accélérer les vitesses de relaxation mais parce qu'ils créent un environnement chimique extrêmement différent se traduisant par des

<sup>133</sup> S. Aime, A. Barge, D. Delli Castelli, F. Fedeli, A. Mortillaro, F. U. Nielsen, E. Terreno, *Magn. Reson. Med.*, **2002**, 47, 639

déplacements chimiques éloignés. Il est donc envisageable de coupler l'IRM  $^{129}\text{Xe}$  à l'IRM  $^1\text{H}$  en greffant un agent PARACEST à une biosonde xénon.

## **B. Concept de la biosonde**

L'idée est de concevoir un objet détectable en IRM  $^{129}\text{Xe}$  et en IRM  $^1\text{H}$ . La biosonde bimodale doit donc comporter un cryptophane capable d'encapsuler le xénon et un complexe de lanthanide paramagnétique comportant des protons échangeables dont le signal est éloigné de celui de l'eau.

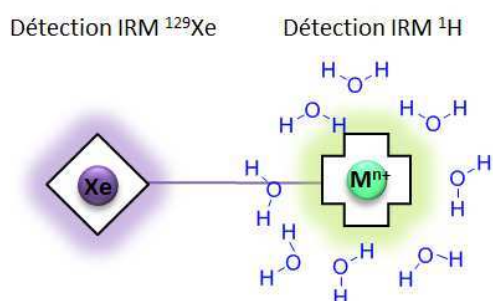


Figure 115 : schéma de la biosonde bimodale

## **C. Synthèse de la biosonde**

### **1. Synthèse des ligands**

Nous avons choisi d'utiliser un ligand de type tétraazadodécane connu pour son excellente affinité pour de nombreux lanthanides. Il sera fonctionnalisé d'un bras espaceur assez long pour minimiser les effets de relaxation du métal paramagnétique sur le xénon hyperpolarisé et comportera une amine terminale permettant de le greffer sur le cryptophane.

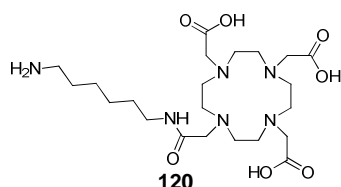


Figure 116 : ligand pour la biosonde bimodale

### a) Ligand long

Le ligand a été obtenu par deux voies différentes.

#### *i- Voie de synthèse 1*

Cette voie est celle utilisée par l'équipe d'Aime<sup>134</sup>. Elle permet d'obtenir le composé avec les trois acides carboxyliques protégés par un groupement tertbutyle (Figure 117).

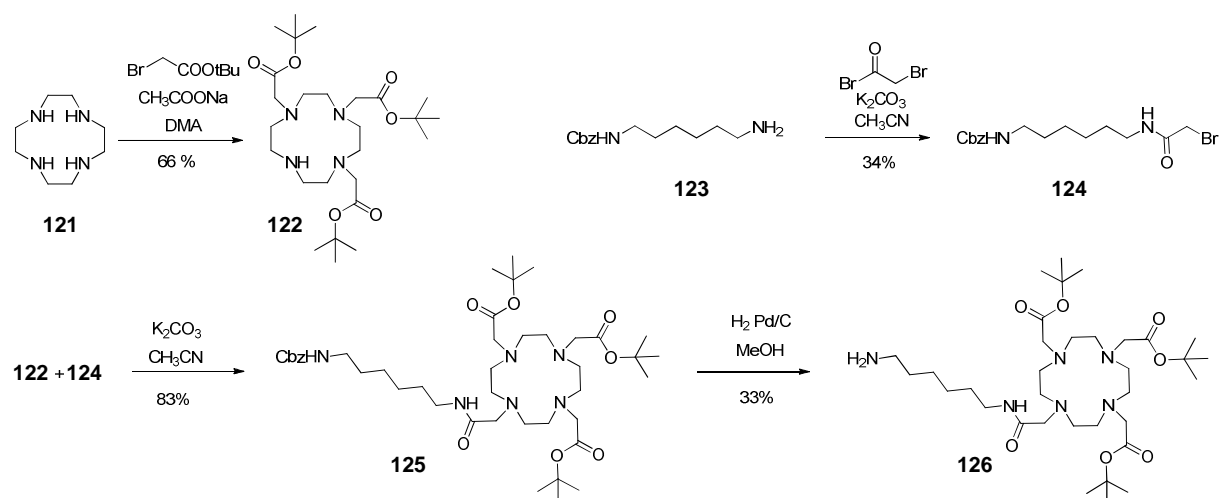


Figure 117 : voie de synthèse 1 du ligand **126**

Le tétraazacyclododécane **122** est obtenu en une étape par trialkylation du cyclen **121** avec 66 % de rendement<sup>135</sup>. L'amine **123** en présence de bromure de bromoacétate et de carbonate de potassium donne le bras espaceur **124**. Le composé **125** est ensuite obtenu par couplage du bromoacétate **124** avec l'amine secondaire de **122** avec 83 % de rendement. Finalement, une hydrogénéolyse avec du palladium sur charbon permet la déprotection de l'amine primaire de **125** pour donner **126** à hauteur de 33 %.

<sup>134</sup> A. Barge, L. Tei, D. Upadhyaya, F. Fedeli, L. Beltrami, R. Stefanià, S. Aime, G. Cravotto, *Org. Biomol. Chem.*, **2008**, 6, 1176

<sup>135</sup> D. A. Moore, *Org. Synth.* **2008**, 85, 10



## ii- Voie de synthèse 2

Le composé **120** peut être obtenu par la voie 1 par déprotection de **126**. Cependant, les faibles rendements des étapes de déprotection du carbamate **125** et d'obtention du bras **124** nous ont poussé à essayer une autre voie de synthèse plus directe décrite par Lu (Figure 118)<sup>136</sup>. Par cette méthode, l'acide bromoacétique est activé en présence de DCC et de NHS pour fournir quantitativement **127** qui est couplé à l'amine **128** pour donner **129** avec un rendement de 73 %. Ce dernier est ensuite engagé avec le cyclen trialkylé **122** puis déprotégé pour conduire au composé **120**.

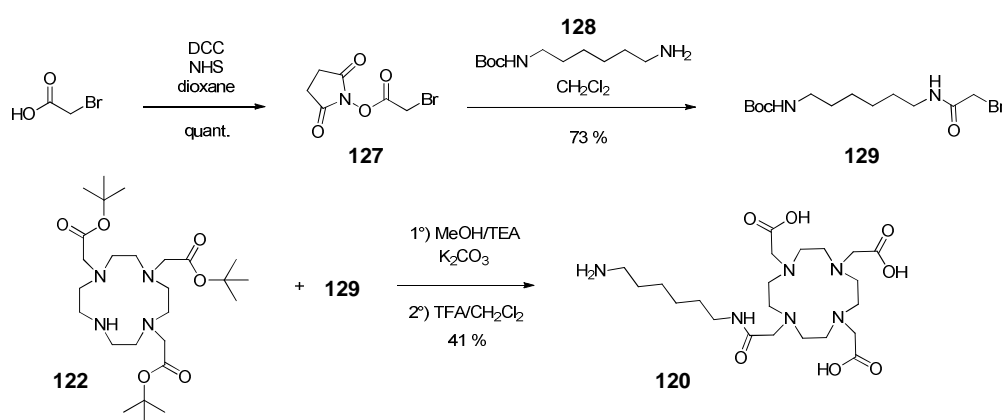


Figure 118 : voie de synthèse 2 du ligand **120**

Le brut réactionnel de la formation de **120** a été analysé par RMN <sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C mais il est assez difficile d'évaluer la pureté du composé à cause de la présence de pics larges. Malgré des spectres RMN convaincants, l'analyse par HPLC du composé montre la présence de produits secondaires. Nous avons donc décidé de purifier ce composé par HPLC sur colonne HILIC. Cette purification permet de séparer deux composés ayant la masse attendue et des temps de rétention différents. L'analyse proton à pH 4 de ces deux composés donne des spectres <sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C un peu différents mais qui pourraient correspondre tous les deux au produit désiré **120**. Ces mêmes composés ont été alors analysés à différents pH.

Les spectres deviennent entièrement superposables à pH 13 et pH 1. Cependant, lorsque le pH des échantillons est réajusté (après traitement acide ou basique) à 4, les spectres sont à nouveau différents.

De plus, l'ajout d'euporium sur chacun de ces deux échantillons conduit à deux spectres proton identiques.

<sup>136</sup> T. Ke, Y. Feng, J. Guo, D. L. Parker, Z-R. Lu, *Magn. Res. Imaging*, **2006**, 24, 931

Nous pensons que ces deux fractions contiennent bien le même ligand **120** mais que l'une d'elles comporte en plus un cation métallique qui serait complexé à pH 4 mais serait libéré à pH acide ou alcalin et déplacé en présence d'euprium.

Le rendement de la réaction a été calculé sur la masse totale obtenue pour ces deux pics. Par la suite, c'est arbitrairement le pic 2 qui a été engagé pour la synthèse de la sonde.

### b) Ligand modèle

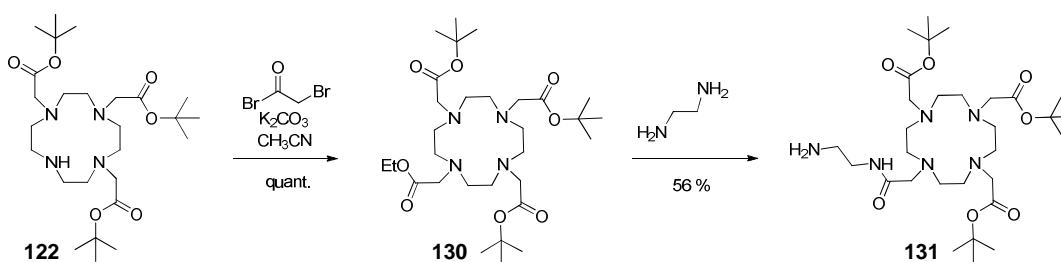


Figure 119 : schéma de synthèse du ligand modèle **131**

Les difficultés de synthèse nous ont également conduit à synthétiser un ligand plus court qui a permis de mettre au point certaines réactions avant d'engager le ligand d'intérêt.

Ce ligand est obtenu en deux étapes à partir du cyclen trialkylé **122** avec un rendement de 56 % (Figure 119).

## 2. Couplage sur le cryptophane-111

### a) Approche rétrosynthétique

Comme pour la détection de métaux, nous avons d'abord voulu obtenir la sonde bimodale à partir du cryptophane-111. Rappelons que ce dernier est un bon candidat pour des applications IRM  $^{129}\text{Xe}$  du fait de son excellente affinité pour le xénon. Le composé monobromé **46** serait comme précédemment lithié puis carbonaté (Figure 120). Le cryptophane acide **98** serait ensuite couplé avec l'amine protégée **126** puis une déprotection des groupements tertbutyle conduirait à la sonde désirée **132**.

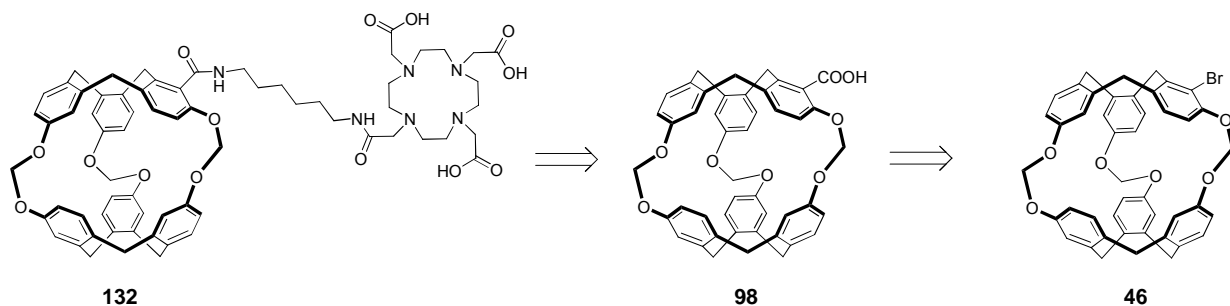


Figure 120 : schéma de rétrosynthèse de la biosonde

### b) Synthèse de la biosonde **132**

Les étapes de synthèse pour l'obtention du cryptophane **99** ont été décrites en partie III.B.1.b). Les essais de couplage ont été optimisés sur le ligand modèle **131** avant d'être testé sur le ligand **126**. Le couplage entre **126** et **98** permet d'isoler le cryptophane **133** avec un rendement de 26 % (Figure 121).

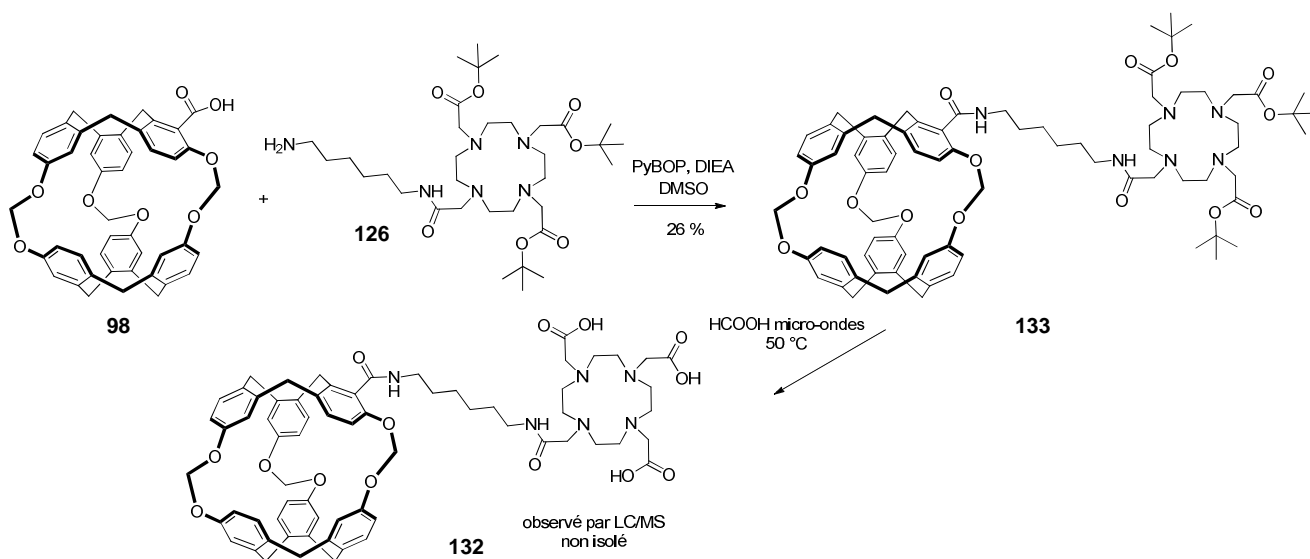
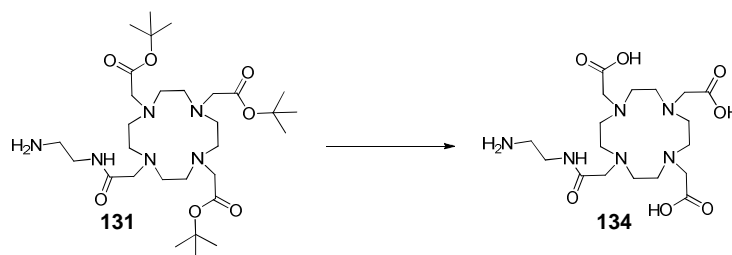


Figure 121 : schéma de synthèse de la biosonde

Afin de déprotéger ce composé, plusieurs conditions ont été testées sur le ligand modèle **131**. En parallèle, nous avons engagé le cryptophane-111 dans les mêmes conditions afin de s'assurer qu'il restait intact. Finalement, la déprotection de **131** est complète avec peu de dégradation du cryptophane-111 après 2 h au four à micro-ondes dans l'acide formique à 50 °C.



Conditions de réaction	Déprotection de <b>131</b>	Cryptophane-111
TFA 1 % dans CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 2 h	Complète	Dégradé
HCl 1M 2 h	Complète	Non soluble
HCOOH 72 h	Pas complète	Intact
HCOOH 3 h micro-ondes 50 °C	Complète	Intact (>90 %)

Tableau 14 : mise au point des conditions de déprotection

Le cryptophane **132** est bien observé par LC/MS dans ces conditions. Cependant, comme dans le cas de la biosonde pour la détection de métaux, nous n'avons jamais pu observer les signaux de **132** dans l'eau. Cela prouve la faible solubilité en milieu aqueux de **132**. On peut difficilement envisager l'utilisation d'un tel composé pour de l'IRM <sup>1</sup>H. Suite à ces problèmes de solubilité et au succès de la synthèse de la biosonde à métaux sur le cryptophane-222 hydrosoluble **35**, nous avons décidé de changer de stratégie.

### 3. Synthèse avec un cryptophane-222 hydrosoluble

#### a) Approche rétrosynthétique

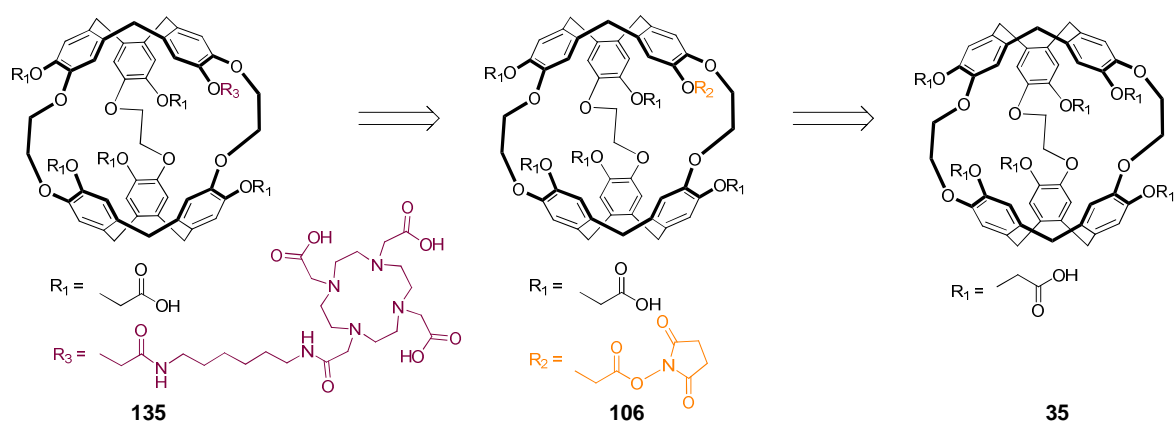


Figure 122 : schéma rétrosynthétique de la biosonde **135**

Comme précédemment, l'approche consiste à former le monoester activé **106** à partir du cryptophane **35** (Figure 122) puis de greffer le ligand déprotégé **120** afin d'aboutir à la sonde désirée **135**.

### b) Synthèse de la biosonde **135**

L'obtention du monoester activé de **35** est favorisée en présence de 1,0 équivalent de NHS et 1,1 équivalents d'EDCI. La réaction est suivie par LC/MS pendant 5h, puis la TEA et le ligand **120** dissous dans le DMSO sont ajoutés. Le brut réactionnel montre la formation de la sonde attendue **135** avec beaucoup de produit de départ **35** et un peu de cryptophane **136** comportant deux ligands.

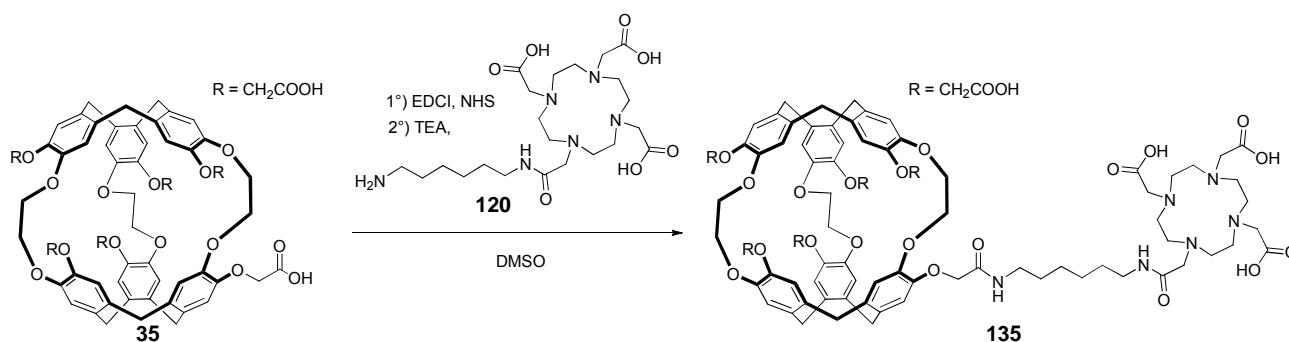


Figure 123 : schéma de synthèse de la biosonde **135**

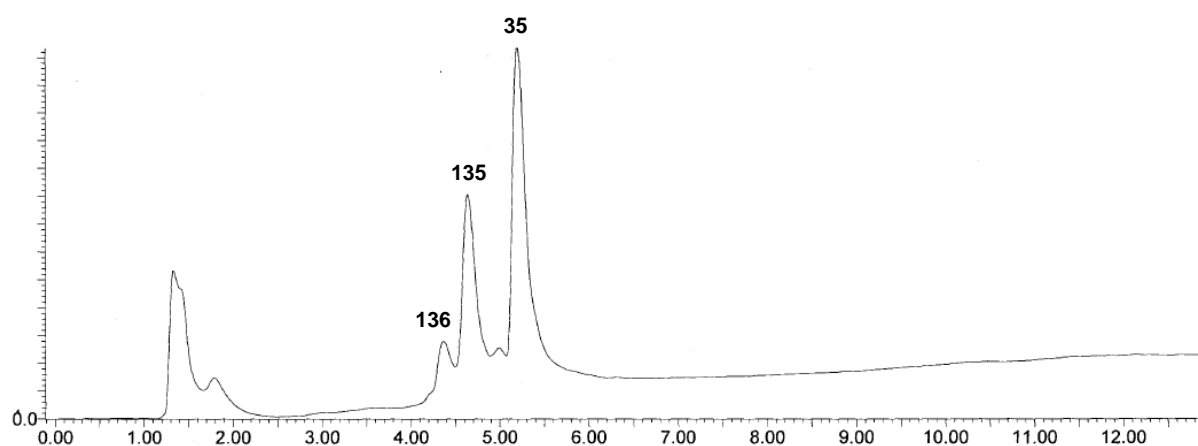


Figure 124 : profil LC/MS du brut réactionnel

Malheureusement, les différents gradient et colonnes essayés en HPLC n'ont pour l'instant jamais permis d'obtenir un composé dont le spectre xénon présente un seul signal pour le

xénon encapsulé dans la biosonde. Il est difficile de savoir s'il s'agit d'un problème de pureté car la réinjection des composés purifiés en HPLC montre un seul pic et la RMN  $^1\text{H}$  est complexe. Les différents pics en xénon peuvent provenir de conformations minoritaires, de formation d'aggrégats ou encore de traces de métaux complexés par le ligand.

## **D. Conclusions**

Dans cette partie, nous avons voulu développer une biosonde bimodale IRM  $^{129}\text{Xe}$ /IRM  $^1\text{H}$ . Nous avons choisi pour cela de greffer un agent PARACEST à un cryptophane. Deux voies ont été envisagées. L'une d'entre elle a été abandonnée car elle a conduit à un composé insoluble dans l'eau. L'autre pose des problèmes d'analyse du composé final. En effet, la sonde après purification donne pour l'instant plusieurs signaux en RMN xénon et il semble difficile de comprendre s'il s'agit d'un problème de pureté, ou des conformations présentes en solution. La complexation d'un métal ne semble pas simplifier les signaux et il semblerait peut-être plus judicieux à ce stade de se tourner vers la synthèse d'autres biosondes basées sur des ligands différents pour ce projet.

## **V. BIOSONDE BIMODALE IRM $^{129}\text{Xe}$ ET** **FLUORESCENCE**





## V. Biosonde bimodale IRM $^{129}\text{Xe}$ et fluorescence

Nous nous sommes attachés dans cette partie à décrire le développement de la première sonde bimodale IRM  $^{129}\text{Xe}$ /fluorescence capable de marquer spécifiquement les protéines "taguées" cystéine. Il s'agit d'exploiter la forte sensibilité de la fluorescence et de visualiser en profondeur grâce à l'IRM. Nous espérons, à long terme, qu'une même biosonde permettra des tests de fluorescence *in cellulo* et un suivi par IRM  $^{129}\text{Xe}$  *in vivo*. Nous avons voulu appliquer cette bimodalité à la détection de protéines marquées qui permet une meilleure compréhension de nombreux mécanismes biologiques.

### A. Marquage de protéines par fluorescence

Le marquage de protéines par des molécules fluorescentes donne accès à de nombreuses études biophysiques et biochimiques concernant la structure et la dynamique des protéines, l'activité enzymatique et les interactions protéine-protéine. Parmi les différentes techniques utilisées, l'encodage génétique de protéines fluorescentes telles que la protéine fluorescente verte (*green fluorescent protein* ou GFP) est une méthode très répandue<sup>137,138</sup>. Elle permet un suivi des protéines à l'intérieur même des cellules par un marquage simple et spécifique (Figure 125).

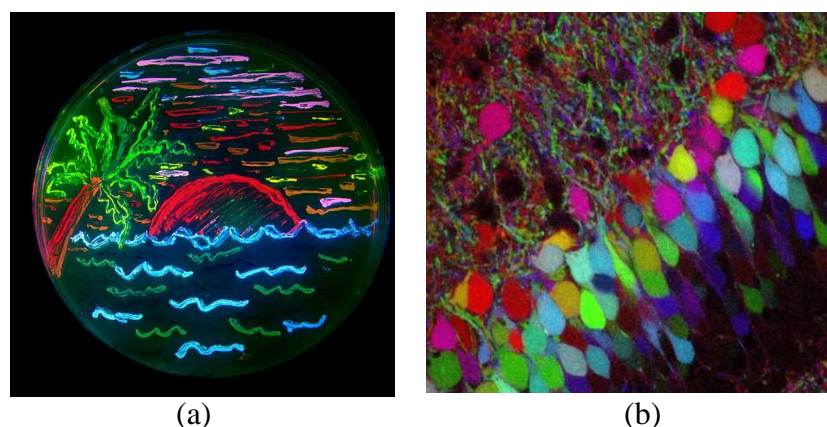


Figure 125 : différentes expériences réalisées à l'aide de la GFP et ses dérivés (a) plage de San Diego dessinée avec des colonies de bactéries exprimant des protéines fluorescentes (b) le "Brainbow" : chaque neurone peut être distingué grâce à l'utilisation de protéines fluorescentes

<sup>137</sup> R. Y. Tsien, *Annu. Rev. Biochem.* **1998**, 67, 509

<sup>138</sup> M. Chalfie, S. R. Kain, Eds., *GFP: Green Fluorescent Protein Strategies and Applications* (Wiley, New York, **1998**)

Cependant, ces protéines fluorescentes ont une taille non négligeable (27 kDa pour la GFP) et peuvent interférer avec la structure et la fonction des protéines auxquelles elles sont fixées. En 1998, le groupe de Tsien publie un nouveau système où le domaine récepteur est composé de seulement six acides aminés naturels qui peuvent être incorporés génétiquement dans la protéine d'intérêt<sup>139</sup>. Le motif consiste en quatre cystéines dans une séquence Cys-Cys-Xaa-Xaa-Cys-Cys où Xaa est un acide aminé quelconque autre qu'une cystéine. Le ligand est une petite molécule appelée FAsH comportant deux arsenics capables de se complexer spécifiquement *in situ* à la tétracystéine avec des constantes de dissociation de l'ordre du nanomolaire (Figure 126). Ce groupement fluoresce uniquement lorsque les deux arsenics sont liés aux thiols des quatre cystéines.

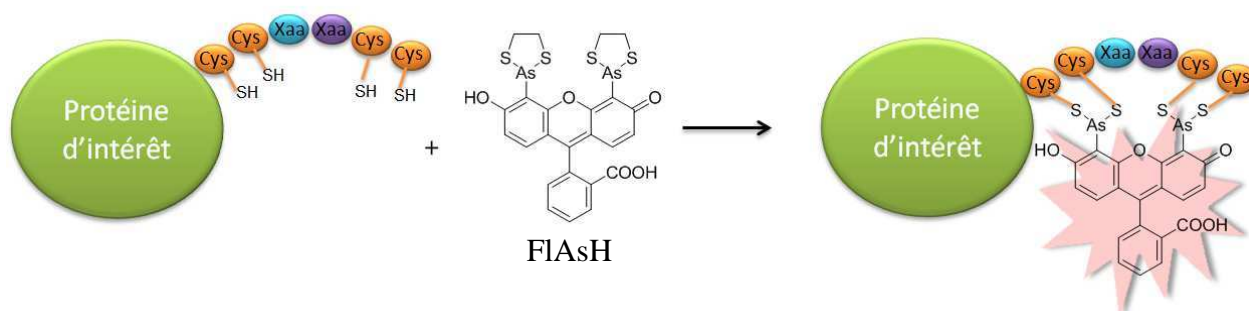


Figure 126 : concept et structure de la sonde FAsH

## **B. Concept de la biosonde**

La biosonde bimodale doit comporter un cryptophane capable d'encapsuler le xénon et un dérivé du fluorophore FAsH. Ainsi, on souhaite que lorsque la biosonde se lie à un motif tétracystéine, la fluorescence augmente drastiquement, et le déplacement chimique du xénon encapsulé varie significativement (Figure 127).

<sup>139</sup> S. R. Adams, R. E. Campbell, L. A. Gross, B. R. Martin, G. K. Walkup, Y. Yao, J. Llopis, R. Y. Tsien, *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, 124, 6063

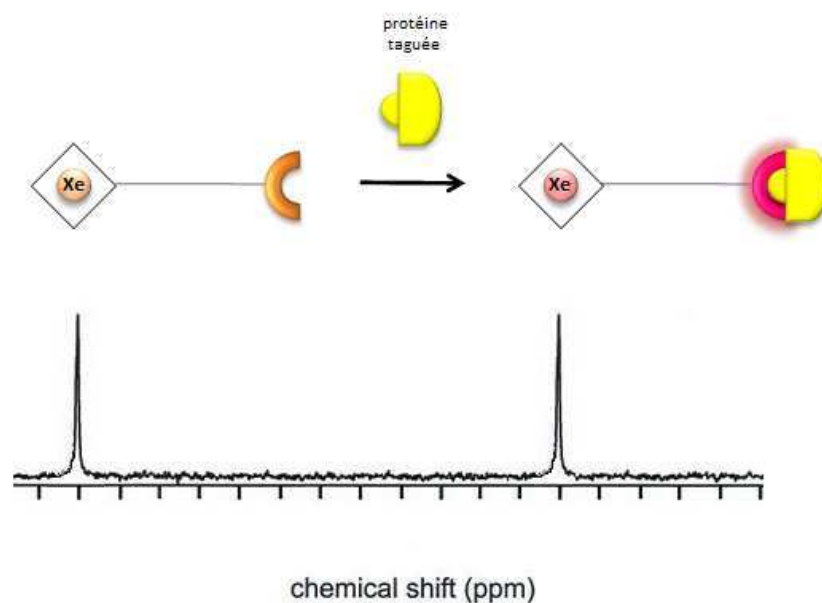


Figure 127 : concept de la biosonde bimodale pour le marquage de protéines "taguées" cystéine

## C. Synthèse

### a) Approche rétrosynthétique

La biosonde **137** que l'on se propose de synthétiser est composée d'un cryptophane hydrosoluble fonctionnalisé par une sonde CrAsH (dérivé de la FAsH) à l'aide d'un bras espaceur de type éthylène diamine (Figure 128).

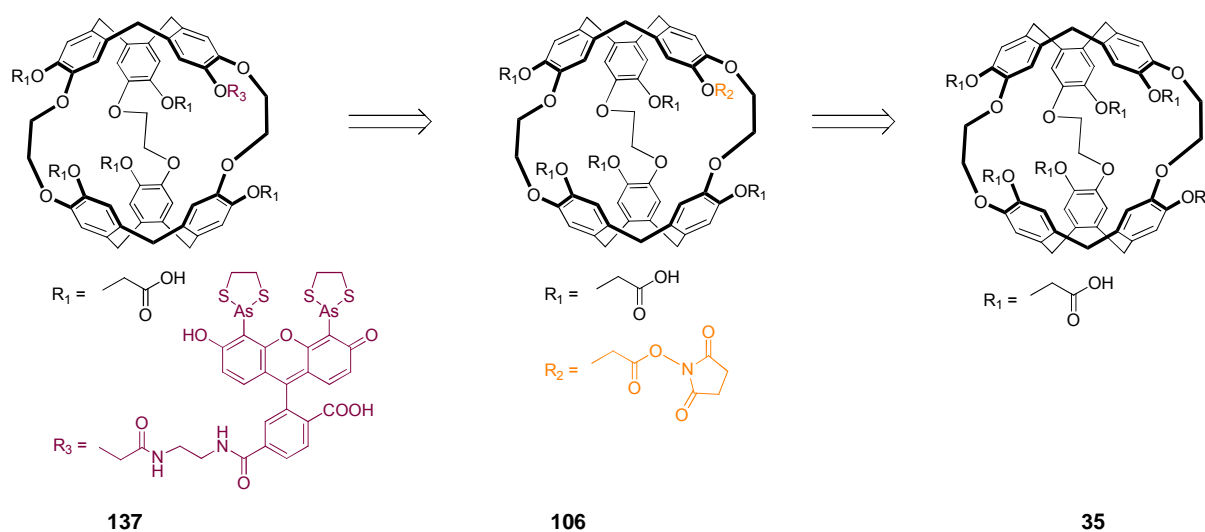


Figure 128 : schéma rétrosynthétique de la biosonde **137**

La biosonde **137** pourrait être obtenue à partir du cryptophane **35** en passant par le même intermédiaire monoactivé **106** que précédemment.

### b) Synthèse du ligand

La sonde CrAsH est synthétisée selon la procédure décrite dans la littérature<sup>140,141</sup> en 4 étapes à partir de l'anhydride **139** et de 2 équivalents de résorcinol **138**. La première étape conduit au mélange équimolaire de 5 et 6-carboxyfluorescéine **140** et **141**. À ce stade, il est possible de séparer ces deux isomères de position par des cristallisations successives mais les rendements sont alors plus faibles. Nous avons donc décidé de poursuivre sur le mélange. En présence d'oxyde de mercure dans l'acide trifluoroacétique, ces composés donnent les dérivés **142** et **143** avec 72 % de rendement. Ces derniers subissent ensuite une transmetallation qui permet d'introduire les deux arsenics qui sont complexés par de l'éthanedithiol pour donner les deux isomères de la sonde CrAsH **144** et **145** avec 42 % de rendement.

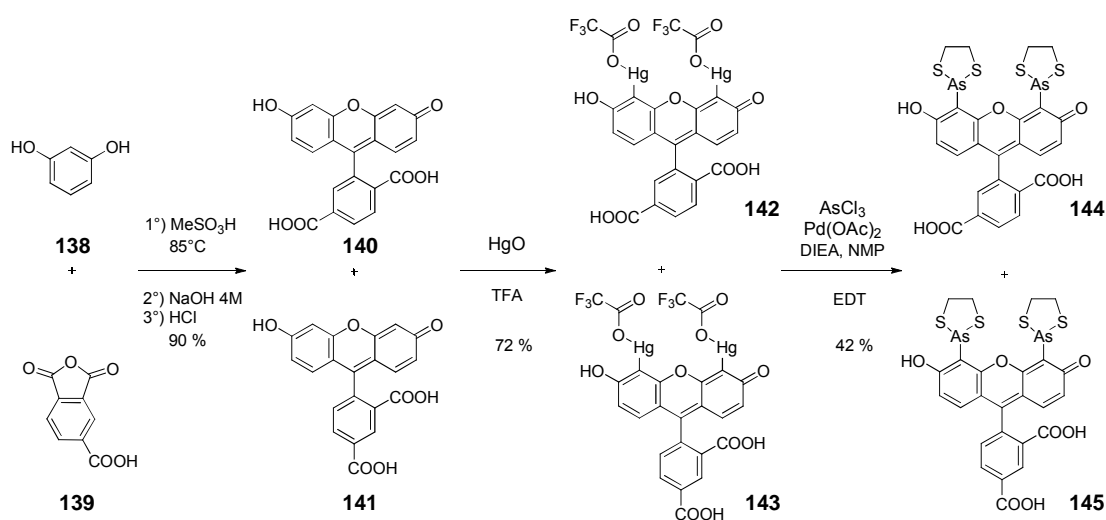


Figure 129 : schéma de synthèse de la sonde CrAsH

L'acide carboxylique en position 5 ou 6 est ensuite activé sélectivement pour donner l'ester hydroxysuccinimide (Figure 130). Ce dernier en présence d'un excès d'éthylène diamine conduit aux composés **146** et **147** (il reste en général toujours un peu des composés **144** et **145**). Ces produits étant peu stables et difficiles à purifier, nous avons choisi d'enlever l'excès

<sup>140</sup> Y. Ueno, G-S. Jiao, K. Burgess, *Synthesis*, **2004**, 15, 2591

<sup>141</sup> E. Genin, O. Carion, B. Malher, B. Dubertret, N. Arhel, P. Charneau, E. Doris, C. Mioskowski, *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, 130, 8596

d'éthylène diamine par filtration sur un patch de silice C18 et d'engager le reste du brut réactionnel dans l'étape suivante.

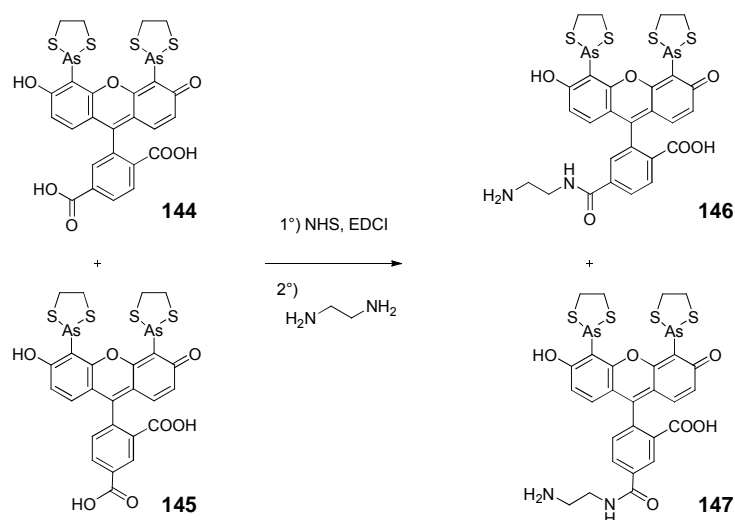


Figure 130 : schéma de synthèse des composés **146** et **147**

### c) Couplage final

De la même manière que précédemment, l'activation du cryptophane se fait avec 1,0 équivalent de NHS et 1,1 équivalents d'EDCI. Cela conduit à la formation majoritaire du composé monoester activé **106** en 5 h avec toujours du produit de départ **35** et les cryptophanes **108** et **109** où respectivement 2 et 3 fonctions acide carboxylique ont été activées (Figure 104). On suit cette réaction par LC/MS.

Le mélange traité de **146** et **147** solubilisé dans du DMSO et de la TEA sont ensuite introduits dans le milieu réactionnel et la réaction est laissée sous agitation à température ambiante pendant 12 h. On observe la formation des biosondes **137** et **148**, il reste du cryptophane **35** et les composés **144** et **145** (Figure 132 et Figure 131). Ces isomères se sont révélés séparables par HPLC et ont pu être isolés avec des rendements respectifs de 10 et 6 %. Le composé **148** n'est en fait pas tout à fait pur car il contient de l'isomère **137**. Pour cette raison, seul le composé **137** a été testé par la suite.

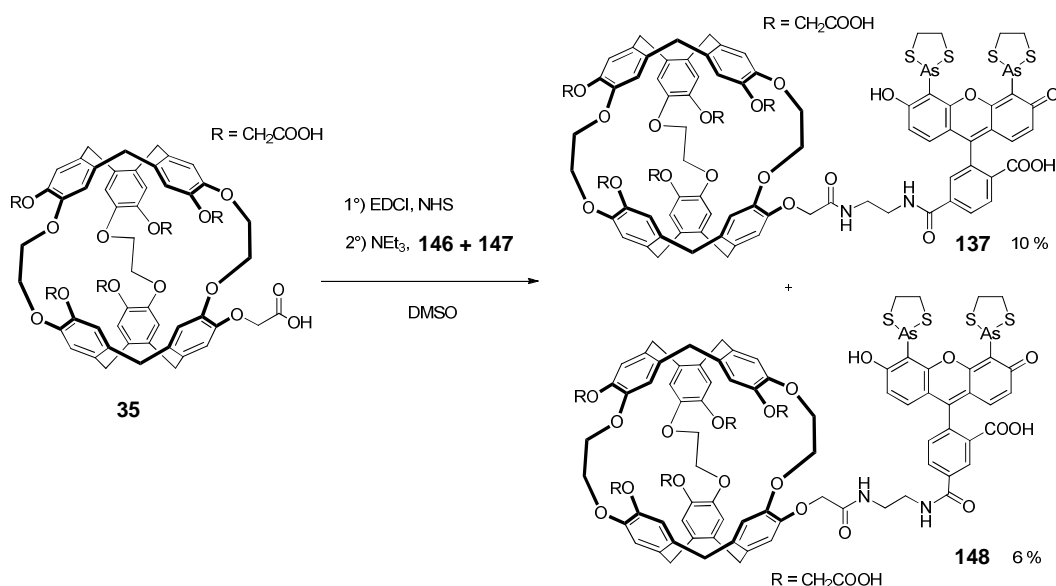


Figure 131 : schéma de synthèse des biosondes **137** et **148**

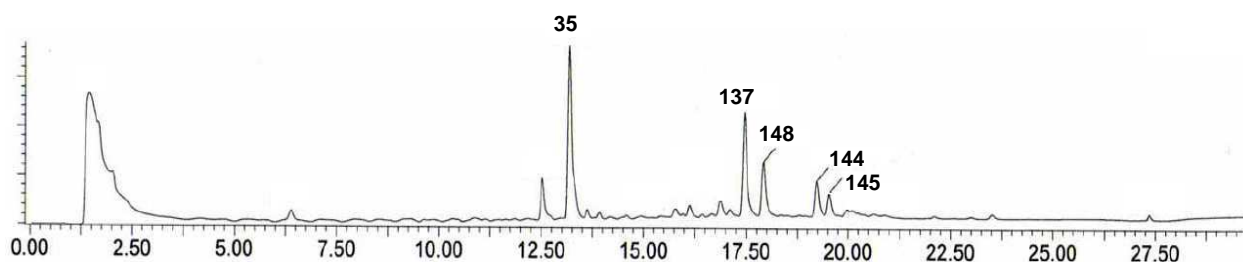


Figure 132 : profil LC/MS du brut réactionnel pour la formation des biosondes **137** et **148**

## D. Caractérisation du complexe biosonde/tétracystéine

### 1. Par fluorescence

Nous avons ensuite voulu vérifier que la biosonde **137** marquait les tétracystéines et que la fluorescence augmentait significativement lors de la formation de la liaison entre les arsenics et les thiols des cystéines. Ces expériences ont été faites en collaboration avec Nathalie Arhel de l'Institut Pasteur.

#### a) Marquage sur une enveloppe virale

Pour cela, nous avons d'abord travaillé dans le laboratoire du Dr. Nathalie Arhel (Institut Pasteur) sur une enveloppe virale HIV-1. Cette enveloppe virale comporte des protéines

"taguées" cystéine surexprimées à sa surface et a déjà été utilisée pour des preuves de concept avec la sonde FLAsH et CrAsH<sup>141,142</sup>.

Cette enveloppe virale est incubée dans un milieu réducteur avec la biosonde pendant 2 h avant d'être centrifugée puis récupérée dans du PBS afin de détecter la fluorescence à 535 nm sous une excitation à 485 nm. Nous avons fait une expérience témoin dans les mêmes conditions avec la sonde FLAsH en parallèle du test sur notre biosonde **137** (Figure 133).

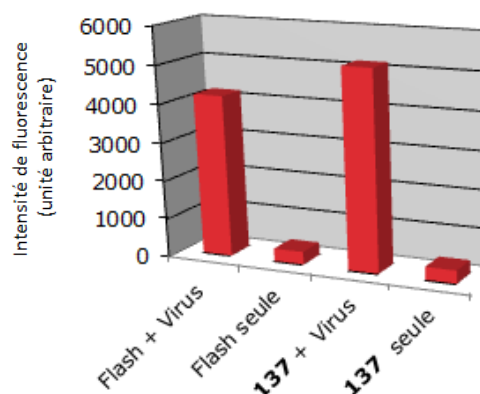


Figure 133 : fluorescence mesurée à 535 nm sous excitation à 435 nm pour la sonde FLAsH seule ou incubée avec l'enveloppe virale et pour la biosonde **137** seule ou incubée sur l'enveloppe virale

Nous avons ainsi pu vérifier que la fluorescence est augmentée significativement pour la biosonde incubée avec l'enveloppe virale comparée à la biosonde seule, ce qui traduit la complexation de notre biosonde aux protéines "taguées" cystéine. L'introduction du cryptophane sur la sonde CrAsH ne gêne ni le marquage des séquences tétracystéine, ni la fluorescence du complexe formé. Obtenir des concentrations détectables en RMN de cette enveloppe virale paraissant un peu long, nous avons décidé de travailler sur une séquence tétracystéine présente sur un petit peptide de 17 acides aminés, déjà utilisé dans le laboratoire du Dr. Nathalie Arhel.

#### b) Marquage sur un peptide

Le peptide utilisé a la séquence suivante : Ace-WEAAAREACCRECCARA-CONH<sub>2</sub>. Nous avons préparé des échantillons avec différents ratios de peptide par rapport à la biosonde et nous avons suivi la fluorescence à 535 nm sous excitation à 480 nm (Figure 134).

On observe que pour tous les ratios, la fluorescence augmente très rapidement pour se stabiliser au bout de 1 à 2 h. D'autre part, la fluorescence augmente logiquement avec le ratio

<sup>142</sup> V. R. Prasad, G. V. Kalpana (eds.), *HIV Protocols: Second Edition*, **2009**, 485, Chapter 11

de peptide. En effet, plus on rajoute de peptide, plus on forme de complexe qui est à l'origine de la fluorescence.

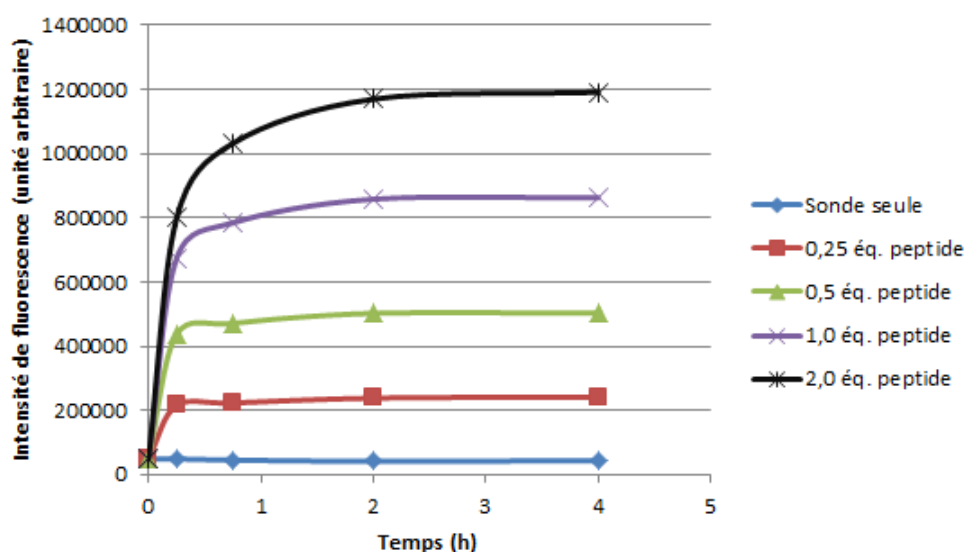


Figure 134 : suivi de la fluorescence à 535 nm sous excitation à 435 nm au cours du temps et avec différents ratios de peptide par rapport à la sonde **137** (50  $\mu$ M)

La saturation du signal n'ayant pas lieu avant 2 équivalents, nous avons préparé de nouveaux échantillons avec cette fois-ci 1, 5, 10 et 50 équivalents de peptide par rapport à la sonde.

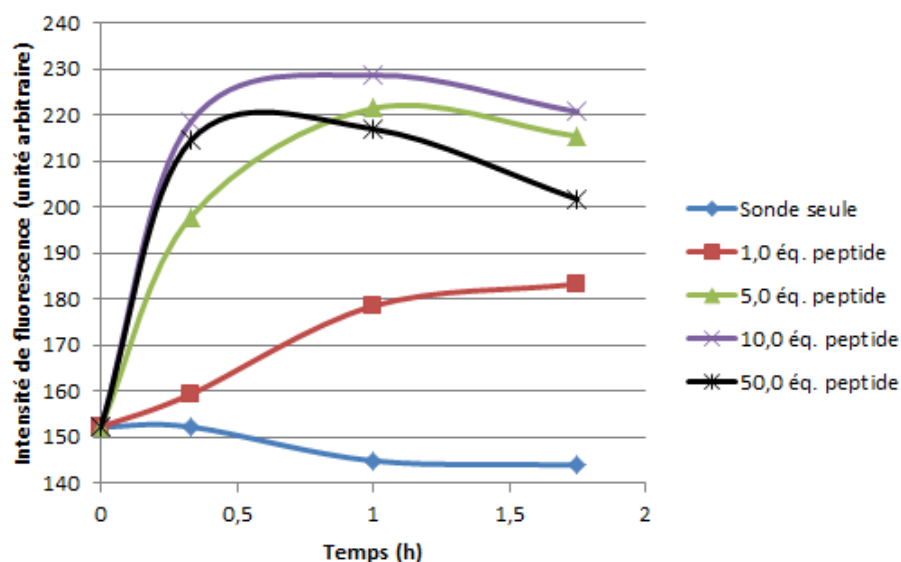


Figure 135 : suivi de la fluorescence à 535 nm sous excitation à 435 nm au cours du temps et avec des ratios plus importants de peptide par rapport à la sonde **137** (2,5  $\mu$ M)

Dans ce cas, les valeurs de fluorescence pour 5, 10 et 50 équivalents sont proches (Figure 135). La baisse de fluorescence au bout de 1 h pour la courbe avec 50 équivalents de peptide



est corrélée à un phénomène de précipitation observé dans l'échantillon préparé. Nous avons estimé qu'un ajout de 10 équivalents était suffisant pour saturer le signal en 1 h et consommer complètement la biosonde **137**.

## 2. Par LC/MS

Il est possible de suivre la formation du complexe biosonde/peptide par LC/MS. Pour cela, trois échantillons ont été préparés : un sans peptide et les deux autres avec 1 et 2 équivalents de peptide. Ces mélanges ont été contrôlés au bout de 24 h à température ambiante (Figure 136).

La biosonde **137** est détectée à un temps de rétention de 7,43 min et on remarque au bout de 24 h la formation d'un autre produit à un temps de rétention de 6,72 min issu de la dégradation qui a la masse de la sonde ayant perdu un arsenic. Avec 1 équivalent de peptide, on voit la formation majoritaire du complexe (ion  $[M+2H]^{2+}$  détecté à  $m/z = 1822,8$ ) avec un nouveau pic à 5,18 min. Il reste un peu de produit de départ. Avec 2 équivalents de peptide, on observe deux pics : un à 5,17 min qui correspond toujours au complexe biosonde/peptide et l'autre à 4,85 min sous lequel on détecte la masse du peptide en excès.

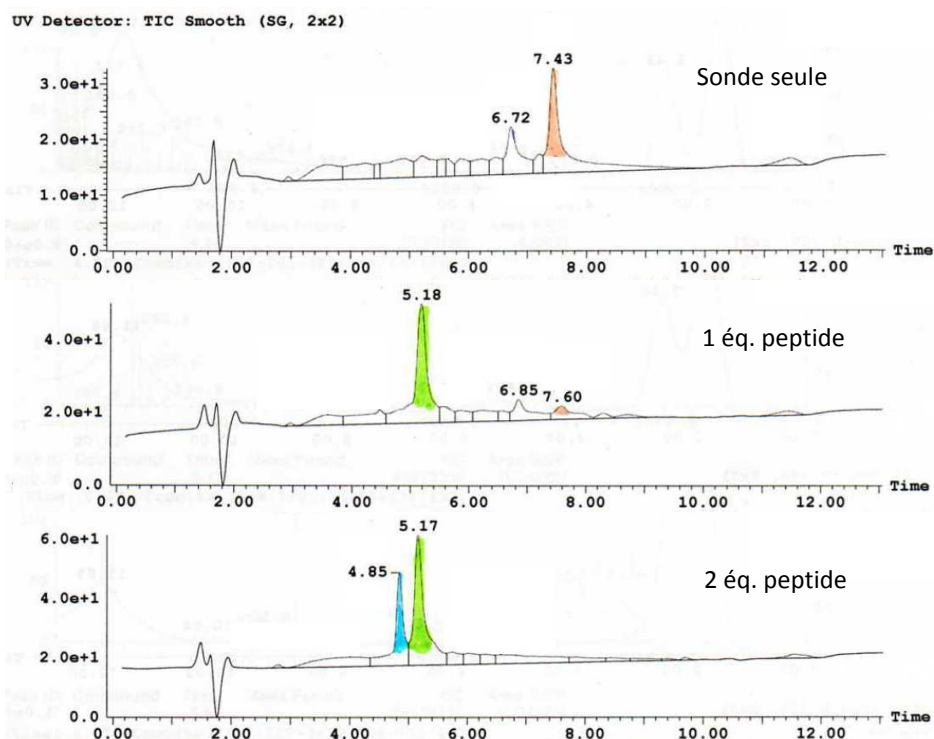


Figure 136 : suivi LC/MS de la complexation biosonde/peptide

La fluorescence et la LC/MS nous permettent de contrôler nos échantillons avant de faire des analyses par RMN  $^{129}\text{Xe}$ .

### 3. Par RMN $^{129}\text{Xe}$

Les caractérisations au xénon ont été à nouveau faites auprès du laboratoire LSDRM du Dr. Patrick Berthault et son équipe.

Nous avons préparé deux échantillons à 25  $\mu\text{M}$  en sonde, un en l'absence de peptide (spectre bleu) et l'autre en présence de 10 équivalents de peptide (spectre rouge) (Figure 137).

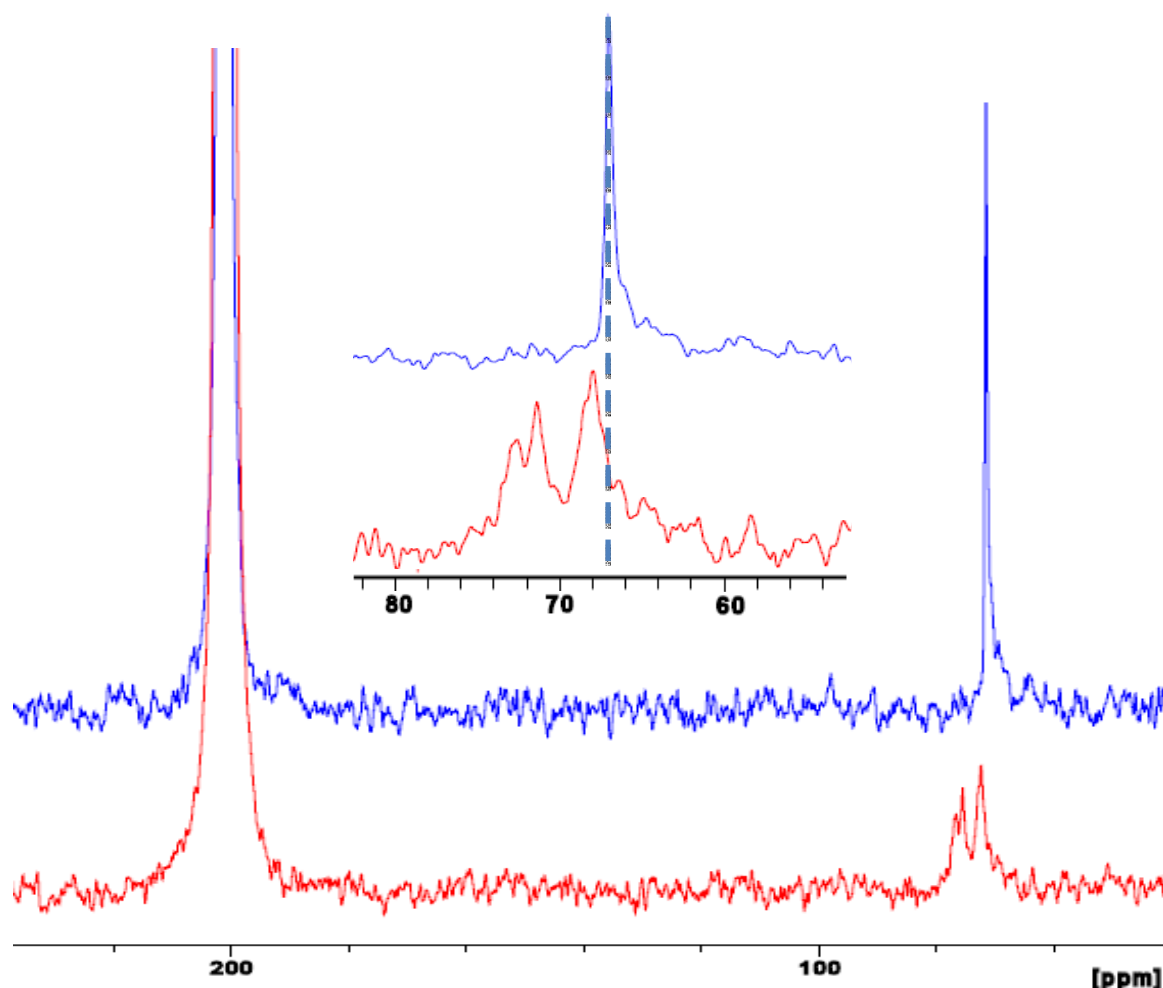


Figure 137 : spectres RMN  $^{129}\text{Xe}$  de la biosonde **137** (25  $\mu\text{M}$ ) en absence (spectre bleu) et en présence de 10 équivalents (spectre rouge) de peptide et zoom sur les spectres de 60 à 80 ppm

Sur les deux spectres, on observe un pic intense de xénon dans l'eau autour de 200 ppm. En l'absence de peptide, on observe un signal unique du xénon encapsulé dans la biosonde **137** à

66,9 ppm. Lorsqu'on ajoute 10 équivalents de peptide, on observe la disparition de ce pic à 66,9 ppm et l'apparition de deux nouveaux massifs à 68,1 et 72,1 ppm. La présence de deux massifs pourrait s'expliquer par la présence de deux diastéréoisomères : un mélange racémique de biosonde est complexé à un peptide chiral énantiopur. Les différents pics au sein des massifs pourraient provenir de différentes complexations possibles des deux arsenics sur les quatre cystéines ou de différentes conformations du peptide.

Compte tenu de ces résultats encourageants, nous avons décidé de synthétiser la biosonde **137** énantiopure afin de ne générer qu'un seul isomère lors de la complexation au peptide.

## E. Biosondes énantiopures

### 1. Synthèse

Les biosondes MM-**137** et PP-**137** ont été synthétisées séparément de la même manière que la biosonde **137** mais en partant des cryptophanes énantiopurs MM-**35** et PP-**35** (Figure 139 et Figure 139). Les cryptophanes MM-**35** et PP-**35** nous ont été à nouveau fournis par le Dr. Thierry Brotin.

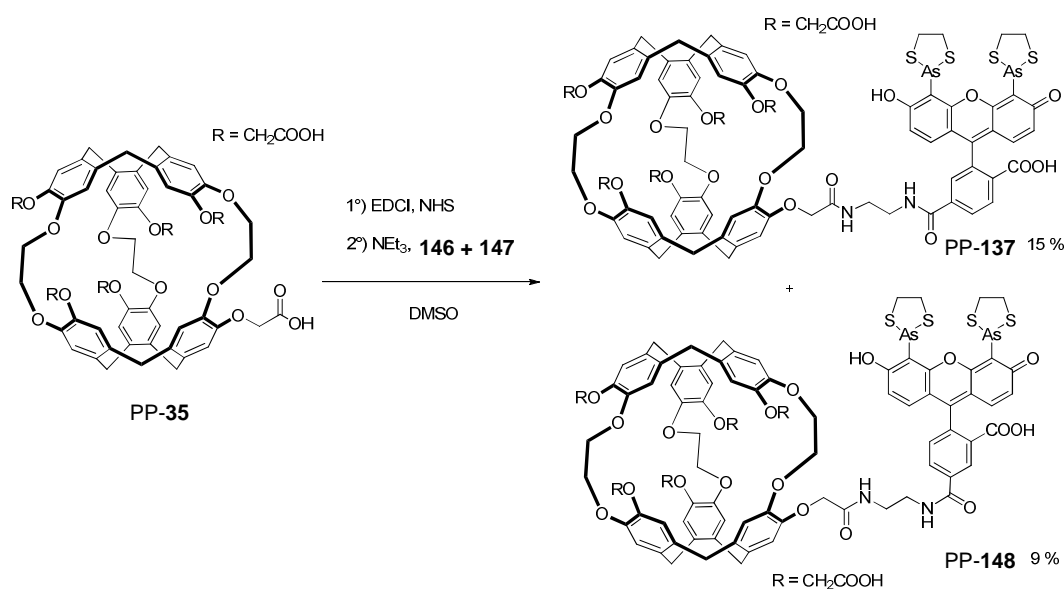


Figure 138 : schéma de synthèse des biosondes PP-**137** et PP-**148**

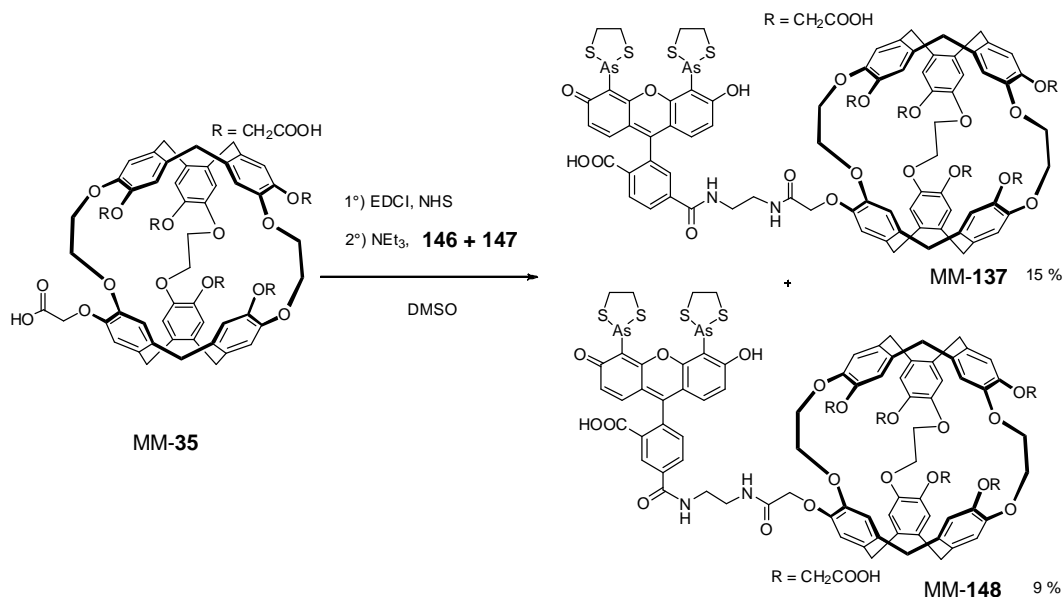


Figure 139 : schéma de synthèse des biosondes MM-137 et MM-148

Comme précédemment, les biosondes désirées MM-137 et PP-137 sont obtenues pures après purification HPLC. Les biosondes MM-148 et PP-148 sont à nouveau obtenues en mélange avec les composés MM-137 et PP-137.

## 2. Fluorescence

Pour chacune des sondes énantiopures, nous avons ensuite préparé deux échantillons à 25  $\mu$ M en sonde, un en l'absence de peptide et l'autre en présence de 10 équivalents de peptide. La fluorescence est ensuite observée à 535 nm sous excitation à 480 nm.

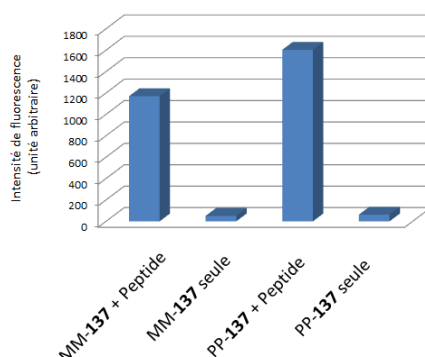


Figure 140 : intensité de fluorescence mesurée à 535 nm sous excitation à 435 nm pour les sondes MM-137 et PP-137 seule ou en présence de peptide

Nous avons ainsi pu vérifier que la fluorescence est augmentée significativement pour les deux biosondes en présence de peptide, ce qui traduit bien la complexation de nos biosondes aux protéines "taguées" cystéine.

### 3. RMN $^{129}\text{Xe}$

Ces nouveaux composés ont été ensuite testés dans les mêmes conditions que précédemment par RMN  $^{129}\text{Xe}$ . Nous avons ensuite préparé les échantillons à 25  $\mu\text{M}$  en sonde, en l'absence de peptide (spectre en haut Figure 141) ou en présence de 10 équivalents de peptide (spectres intermédiaires).

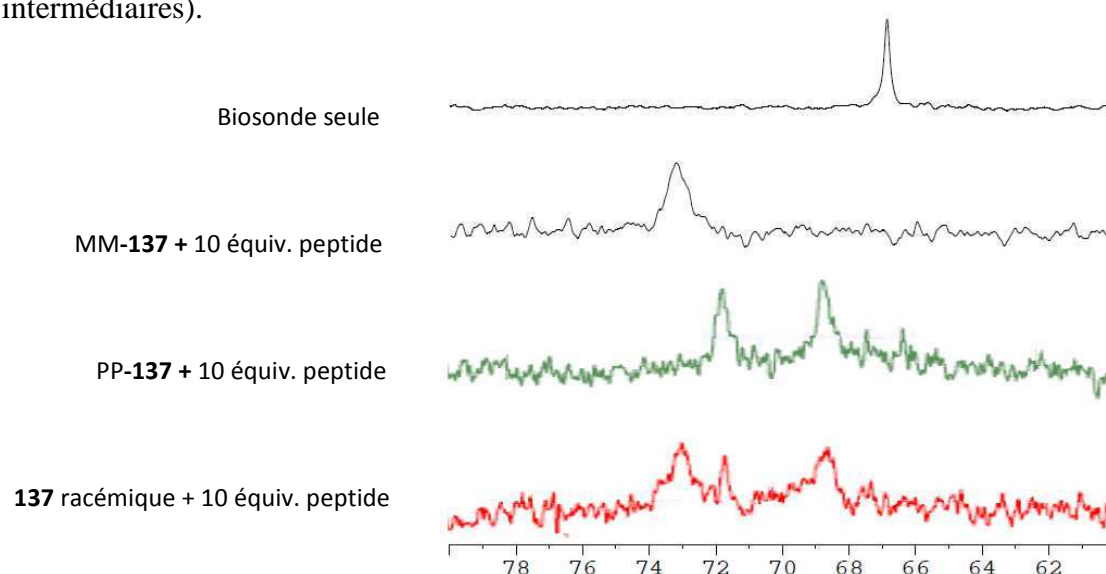


Figure 141 : spectres RMN  $^{129}\text{Xe}$  entre 60 et 80 ppm (de haut en bas) : de la biosonde seule, de MM-**137** en présence de 10 équivalents, de PP-**137** en présence de 10 équivalents et de la biosonde racémique en présence de 10 équivalents

Les spectres sans peptide sont identiques au précédent avec un signal unique du xénon encapsulé dans la biosonde MM-**137** ou PP-**137** à 66,9 ppm. Par contre, lors du rajout des 10 équivalents de peptide, on observe pour l'énantiomère MM-**137**, la disparition de ce pic à 66,9 ppm accompagné de l'apparition d'un unique pic large à 73,3 ppm. Ce pic semble bien correspondre au pic le plus déblindé présent dans le massif à 72,1 ppm du spectre RMN  $^{129}\text{Xe}$  obtenu avec la biosonde racémique. Pour l'énantiomère PP-**137**, on observe deux pics à 68,4 et 71,9 ppm qui correspondent aux pics restants du spectre RMN  $^{129}\text{Xe}$  obtenu avec la biosonde racémique. La présence de ces deux pics peuvent s'expliquer par des conformations possibles du complexe biosonde-tétracystéine. En effet, le peptide utilisé a été choisi pour sa capacité à favoriser la formation d'une hélice  $\alpha$ , ce qui permet d'imaginer deux modes de

complexation pour notre sonde (Figure 142). Soit un arsenic se fixe à deux thiols adjacents (cas A), soit il se fixe à deux thiols appartenant à deux brins parallèles du peptide (cas B). Cela n'explique cependant pas la présence d'un pic pour l'énantiomère MM-137. Il serait intéressant de reproduire ces expériences, de faire varier les ratios de peptide les concentrations de biosonde afin de mieux comprendre la nature de ces signaux.

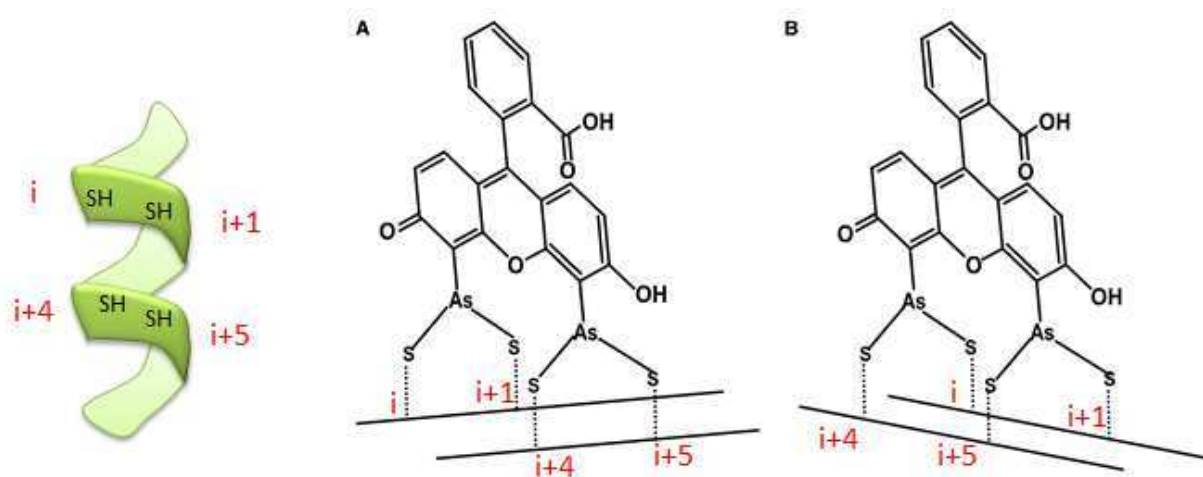


Figure 142 : modes de complexation possibles de la sonde à la tétracystéine

Quoiqu'il en soit, le résultat obtenu avec la biosonde énantiopure MM-137 est extrêmement positif. En effet, l'écart de 6,4 ppm du déplacement chimique du xénon encapsulé dans la sonde en absence et en présence de peptide est largement suffisant pour envisager de l'IRM  $^{129}\text{Xe}$  pour la détection de protéines marquées.

## F. Conclusions

Nous avons synthétisé la première biosonde bimodale IRM  $^{129}\text{Xe}$ /fluorescence capable de marquer spécifiquement des protéines "taguées" cystéine. Cette sonde est composée d'un cryptophane hydrosoluble et d'un fluorophore CrAsH. Lorsque les deux arsenics de la sonde complexent les thiols des quatre cystéines, la fluorescence augmente significativement. Les polarités du complexe, du peptide et de la biosonde sont suffisamment différentes pour permettre un suivi par LC/MS. En RMN  $^{129}\text{Xe}$ , on observe un pic unique du xénon encapsulé dans la biosonde en l'absence de peptide. Pour la biosonde racémique, l'ajout de peptide provoque la disparition de ce pic, et l'apparition de deux nouveaux massifs à des

déplacements chimiques différents. Suite à ces résultats encourageants, nous avons synthétisé puis testé la biosonde énantio pure. Pour cette dernière, le spectre RMN  $^{129}\text{Xe}$  en présence de peptide présente un seul pic avec un écart de déplacement chimique de 6,4 ppm par rapport à la biosonde seule.

Les résultats sur cette biosonde sont donc extrêmement prometteurs. Il serait souhaitable de faire d'autres essais avec des ratios de peptide et des concentrations en sonde différents pour mieux comprendre les signaux RMN  $^{129}\text{Xe}$ . Nous aimerions également visualiser la complexation de notre biosonde à l'enveloppe virale par RMN  $^{129}\text{Xe}$ .





## **CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES**

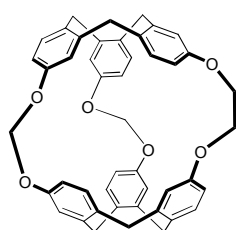


## Conclusions

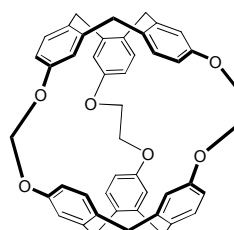
L'objectif de ce travail de recherche était de concevoir et de synthétiser de nouveaux cryptophanes pour des applications en IRM  $^{129}\text{Xe}$ .

Dans une première partie de ma thèse, nous nous sommes intéressés au développement de nouvelles cages afin d'étudier et d'affiner les propriétés d'encapsulation du xénon au sein des cryptophanes. Les résultats obtenus sont les suivants :

✚ Deux nouvelles cages de cavités intermédiaires, les cryptophanes -112 et -122, ont été obtenus par une nouvelle voie de synthèse qui permet d'isoler des intermédiaires ouverts. Ces cages encapsulent bien le xénon et possèdent une vitesse d'échange étonnamment élevée.

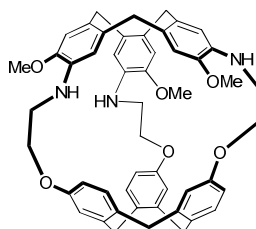


cryptophane-112



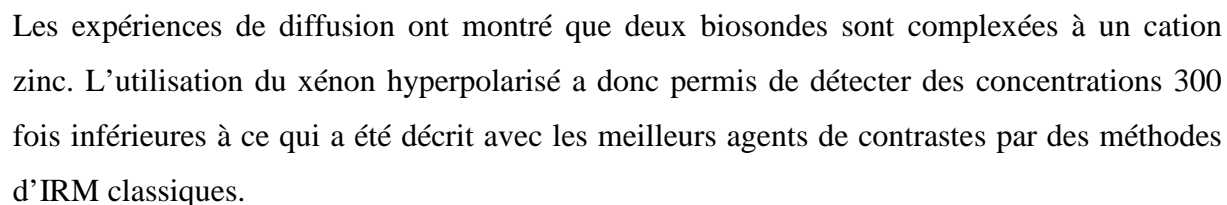
cryptophane-122

✚ Une stratégie nouvelle permettant de coupler deux CTV différents a donné accès à une cage originale aux ponts azotés : le cryptophaniline **96**. Les conditions restent à optimiser mais ce composé est prometteur puisqu'il possède un déplacement chimique spécifique du xénon encapsulé.



**96**

Une biosonde pour la détection sensible de métaux qui permet de visualiser jusqu'à 100 nM en zinc a été synthétisée. Pour cela, une stratégie de monoactivation du cryptophane **35** a été développée et optimisée. Nous avons isolé les diastéréoisomères **105a** et **105b** et mis en évidence l'importance de travailler avec des cryptophanes énantiopures. La biosonde **105b** donne une signature spécifique au xénon encapsulé lorsqu'elle chélate du zinc avec une différence de déplacement chimique de 1,7 ppm comparé au xénon encapsulé dans la biosonde en l'absence de métaux.

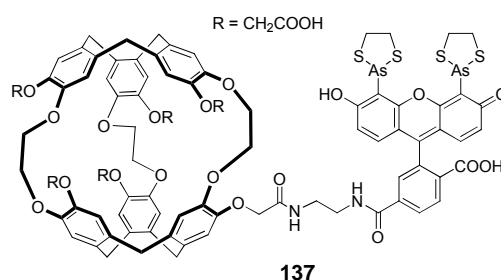


🧩 Nous avons également tenté de développer une biosonde bimodale IRM  $^{129}\text{Xe}$ /IRM  $^1\text{H}$ . Nous avons choisi pour cela de greffer un agent PARACEST à un cryptophane.



Deux voies ont été envisagées. L'une d'entre elle a été abandonnée car elle a conduit à un composé insoluble dans l'eau. L'autre pose des problèmes d'analyse du composé final. En effet, la sonde après purification donne pour l'instant plusieurs signaux en RMN xénon et il semble difficile de comprendre s'il s'agit d'un problème de pureté, ou des conformations présentes en solution. La complexation d'un métal ne semble pas simplifier les signaux et il semblerait peut-être plus judicieux à ce stade de se tourner vers la synthèse d'autres biosondes basées sur des ligands différents pour ce projet.

Enfin, nous avons synthétisé la première biosonde bimodale IRM  $^{129}\text{Xe}$ /fluorescence capable de détecter spécifiquement des protéines "taguées" cystéine. Cette sonde est composée d'un cryptophane hydrosoluble et d'un fluorophore CrAsH.



Lorsque les deux arsenics de la sonde complexent les thiols des quatre cystéines d'un peptide d'intérêt, la fluorescence augmente significativement. Les polarités du complexe, du peptide et de la biosonde sont suffisamment différentes pour permettre un suivi par LC/MS. En RMN  $^{129}\text{Xe}$ , on observe un pic unique du xénon encapsulé dans la biosonde en l'absence de peptide. Ce pic disparaît lors de l'ajout de peptide et, dans le cas de la biosonde racémique, nous avons constaté l'apparition de trois signaux à des déplacements chimiques différents. Ces signaux pouvant provenir des deux diastéréoisomères formés lors du couplage du peptide énantio pur avec la biosonde racémique, nous avons décidé de synthétiser les biosondes énantio pures MM-**137** et PP-**137**. Les spectres RMN  $^{129}\text{Xe}$  de ces nouveaux composés en présence de peptide présentent soit des signaux complémentaires : un seul pic bien différent du pic obtenu pour la biosonde seule (6,4 ppm d'écart) pour MM-**137** et deux pics moins déblindés pour le composé PP-**137**. Les résultats sur cette biosonde sont donc extrêmement prometteurs.

## Perspectives

Plusieurs perspectives sont envisagées pour la suite de ces travaux :

✚ Les cryptophanes -112 et -122 présentent des propriétés inattendues d'encapsulation du xénon. Des travaux sont en cours en RMN  $^{129}\text{Xe}$  pour essayer de comprendre ce phénomène d'encapsulation inattendu qui paraît extrêmement intéressant.

✚ L'étude en RMN  $^{129}\text{Xe}$  du cryptophaniline **96** permettrait de déterminer des paramètres pertinents comme son affinité pour le xénon. Il serait très intéressant de décliner la stratégie employée pour la synthèse du cryptophaniline **96** à d'autres CTV pour former des cages hydrosolubles et de les fonctionnaliser au niveau des azotes.

✚ L'étude de la détection d'autres cations par la biosonde pour la détection du zinc est en cours par l'équipe de Patrick Berthault. La synthèse de dérivés avec un bras espaceur de différentes longueurs, ou le remplacement des groupements carboxylate pourraient nous permettre de mieux comprendre la relation entre le déplacement chimique du xénon encapsulé et la structure du complexe de zinc formé.

✚ L'idée de coupler l'IRM  $^1\text{H}$  et  $^{129}\text{Xe}$  reste intéressante, la synthèse d'autres biosondes basées sur des ligands différents pourrait être envisagée pour ce projet.

✚ Il serait souhaitable d'essayer des ratios de peptide et des concentrations en biosonde différents pour mieux comprendre les signaux RMN  $^{129}\text{Xe}$  obtenus avec le composé **137**. Nous aimerions également visualiser la complexation de notre biosonde avec une enveloppe virale, développée par Nathalie Arhel, qui contient plusieurs centaines de protéines "taguées" cystéine.

## **PARTIE EXPÉRIMENTALE**





## **Partie expérimentale**

### Solvents and reagents

All experiments in anhydrous conditions were carried out with dry glassware under nitrogen dried on sodium carbonate and silica gel.

Anhydrous solvents are obtained by distillation under nitrogen atmosphere in presence of dehydrating agents: calcium hydride for dichloromethane and sodium with benzophenone for diethyl ether and tetrahydrofurane.

If not indicated, commercial products were used without further purification.

### Purification and analyses

Purifications by column chromatography on silica gel were achieved either by gravity, or under air or nitrogen pressure using Merck silica gel (granulometry 40-63  $\mu\text{m}$ ). The eluents are indicated in protocols for each purification.

Purifications by combiFlash® were achieved on a RediSep apparatus (Serlabo Technologies, Teledyn ISCO) using "pre-packed"  $\text{SiO}_2$  for normal phase or C18 for reverse phase. Thin layer chromatographies (TLC) were carried out on Merck 60 F254 silica on glass plates.

Products are revealed under ultraviolet light at 254 nm or in reaction with iodine vapors, potassium permanganate and potassium carbonate or with a phosphomolybdic acid solution 5 % weight in ethanol.

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz),  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz) spectra and complementary experiments (DEPT 135, COSY, HSQC, NOESY) were recorded on a Bruker 400 MHz spectrometer with an Avance calculator. Resonance frequencies of atoms are respectively at 400.13 MHz for proton and 100.61 MHz for carbon 13.

Chemical shifts are reported in parts per million (ppm,  $\delta$ ) downfield from residual solvent peaks and coupling constants are reported in Hertz (Hz). References are respectively chloroform protons ( $\delta = 7.26$  ppm) or tetramethylsilane protons ( $\delta = 0.00$  ppm) in  $^1\text{H}$  NMR, chloroform carbon ( $\delta = 77.00$  ppm) in  $^{13}\text{C}$  NMR.

Splitting patterns are designated as singlet (s), broad singlet (bs), doublet (d), triplet (t). Splitting patterns that could not be interpreted or easily visualized are designated as multiplet (m).

Infrared spectra (IR) were recorded on a Perkin Elmer system 2000 FTIR spectrophotometer and are reported as wavelength numbers ( $\text{cm}^{-1}$ ). Infrared spectra were recorded by preparing a KBr pellet containing the title compound.

Electrospray mass spectra were recorded using an ESI/TOF Mariner Mass Spectrometer. In the description of mass spectra, “M” is the molar mass of the analysed molecule. High resolution mass spectra (HRMS) were recorded at the Institut de Chimie des Substances Naturelles (ICSN) in Gif-sur-Yvette.

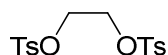
CD detection Chiral HPLC profiles were recorded with the help of Emilie Kolodziej and Professor Emmanuelle Schultz in the Université Paris Sud.

$^{129}\text{Xe}$  NMR spectra and complementary analyses (SPINOE, diffusion) as well as some  $^{13}\text{C}$  NMR and HSQC spectra were all kindly done at the Laboratoire de Structure et Dynamique par Résonance Magnétique (LSDRM) by Patrick Berthault and his team.

Fluorescence experiments were done in collaboration with Nathalie Arhel from the Institut Pasteur who provided us with virus and peptide (and advised us thoughtfully).

## Synthesis

### Ethylène glycol ditosylate



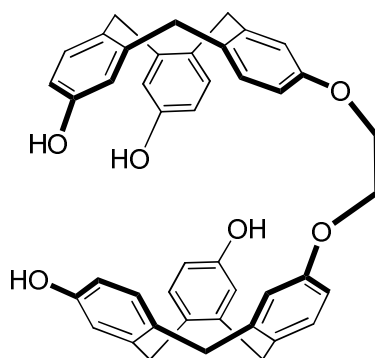
A solution of ethylene glycol (0.9 mL, 16.1 mmol) in pyridine (20 mL) was added over 30 minutes to a solution of tosyl chloride (9.2 g, 48.3 mmol) in pyridine (10 mL) at 0°C. The mixture was stirred for 5 hours, poured onto crushed ice and filtered on a sintered glass funnel. The white precipitate was washed with cold water, hot methanol to yield the desired compound (5.24 g, 88%).

This product was previously synthesized using a different method and was described in literature<sup>143</sup>.

---

<sup>143</sup> F. Ribes, R. Guglielmetti, J. Metzger, *Bull. Soc. Chim. Fr.*, **1972**, 143

### Compound 83



To a solution of compound **40** (100 mg, 0.31 mmol) in *N,N*-dimethylformamide (DMF, 4 mL) were added cesium carbonate (1.0 g, 3.10 mmol) and the ethylene glycol bistosylate (58 mg, 0.15 mmol) and the solution was stirred overnight at 60°C. After filtration and removal of the solvent under reduced pressure, reverse phase chromatography (acetonitrile/H<sub>2</sub>O TFA 0.1%), 20:80 to 100:0) afforded compounds **83** (31 mg, 30%).

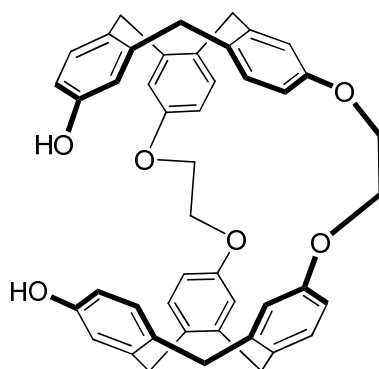
White solid

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO): δ 7.31 (d, 2 H, *J* = 7.2 Hz), 7.29 (d, 2H, *J* = 7.2 Hz), 7.20 (d, 2H, *J* = 8.4 Hz), 7.02 (d, 2H, *J* = 2.8 Hz), 6.88 (dd, 4H, *J* = 2.8 Hz, *J* = 7.2 Hz), 6.68 (dd, 2H, *J* = 2.4 Hz, *J* = 8.6 Hz), 6.55 (dd, 4H, *J* = 2.4 Hz, *J* = 8.4 Hz), 4.75-4.82 (m, 6H), 4.23 (s, 4H), 3.63-3.52 (m, 6H)

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMF-d<sub>6</sub>): δ 157.6, 156.6, 142.2, 141.9, 141.56, 132.5, 131.3, 131.2, 131.1, 130.6, 130.5, 130.4, 116.4, 115.9, 113.9, 113.8, 112.7, 66.8, 36.0

HRMS-ES<sup>-</sup> (*m/z*) calcd for C<sub>44</sub>H<sub>37</sub>O<sub>6</sub>, 661.2588 found 661.2590 ([M-H]<sup>-</sup>)

### Compound 84



To a solution of compound **40** (1.0 g, 3.1 mmol) in *N,N*-dimethylformamide (DMF, 40 mL) were added cesium carbonate (10.2 g, 31.0 mmol) and the ethylene glycol bistosylate (1.40 g, 3.8 mmol) and the solution was stirred overnight at 60°C. After filtration and removal of the solvent under reduced pressure, flash column chromatography (dichloromethane/methanol, 0.1:99.9 to 10:90) afforded compound **84** (66 mg, 6%).

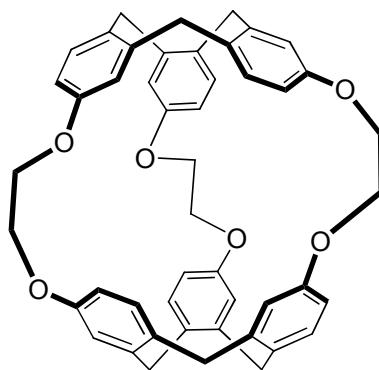
Yellow solid

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMF- $d_6$ ):  $\delta$  7.60 (d, 2 H,  $J$  = 8.0 Hz), 7.17 (d, 2H,  $J$  = 8.0 Hz), 7.15 (d, 2H,  $J$  = 8.0 Hz), 7.08 (s, 2H), 6.87 (s, 2H), 6.81 (d, 2H,  $J$  = 8.8 Hz), 6.79 (s, 2H), 6.48 (d, 2H,  $J$  = 6.4 Hz), 6.46 (d, 2H,  $J$  = 6.4 Hz), 4.87 (d, 2H,  $J$  = 13.2 Hz), 4.74-4.66 (m, 4H), 4.59 (d, 2H,  $J$  = 12.8 Hz), 4.44-4.40 (m, 2H), 4.30-4.26 (m, 2H), 4.18 (d, 2H,  $J$  = 10.8 Hz), 3.64 (d, 2H,  $J$  = 12.8 Hz), 3.54-3.45 (m, 6H)

$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz, DMF- $d_6$ ):  $\delta$  157.2, 156.4, 155.6, 141.5, 141.4, 133.1, 131.2, 130.9, 130.6, 129.9, 117.5, 116.2, 115.3, 113.8, 112.8, 109.8, 65.3, 64.7, 35.6, 35.4

HRMS-ES $^-$  (m/z) calcd for  $\text{C}_{46}\text{H}_{39}\text{O}_6$ , 687.2775 found 687.2747 ( $[\text{M}-\text{H}]^-$ )

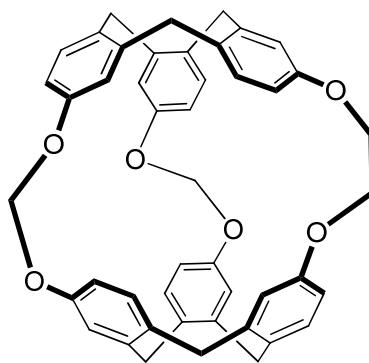
### Compound 80



To a solution of compound **40** (661 mg, 2.1 mmol) in *N,N*-dimethylformamide (DMF, 40 mL) were added cesium carbonate (6.8 g, 21.0 mmol) and the ethylene glycol bistosylate (1.0 g, 2.7 mmol) and the solution was stirred overnight at 60°C. After filtration and removal of the solvent under reduced pressure, flash column chromatography (dichloromethane/methanol, 0.1:99.9 to 10:90) afforded a residue that was diluted in large volumes of cyclohexane. The precipitate was filtered off and the organic phase evaporated to afford compound **80** (10 mg, 1.5 %).

This compound was previously described in literature<sup>99</sup>.

### Compound **81**



To a solution of compound **83** (153 mg, 0.23 mmol) in *N,N*-dimethylformamide (DMF, 45 mL) were added cesium carbonate (7.5 g, 2.3 mmol) and bromochloromethane (7.5 mL, 1.15 mmol) and the mixture was stirred overnight at 80°C. After filtration and removal of the solvent under reduced pressure, flash column chromatography (dichloromethane/methanol, 0.1:99.9 to 10:90) afforded compound **81** (45 mg, 27%).

White solid

$^1\text{H}$  NMR (700 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_4$ ):  $\delta$  7.06 (d, 4H,  $J$  = 8.4 Hz), 6.98 (d, 2H,  $J$  = 9.1 Hz), 6.78 (dd, 2H,  $J$  = 2.8 Hz,  $J$  = 8.4 Hz), 6.73 (d, 2H,  $J$  = 2.1 Hz), 6.68 (dd, 4H,  $J$  = 2.8 Hz,  $J$  = 7.7 Hz), 6.63 (dd, 2H,  $J$  = 2.8 Hz,  $J$  = 8.4 Hz), 6.60 (d, 2H,  $J$  = 2.1 Hz), 5.72 (d, 2H,  $J$  = 7.0 Hz), 5.66 (d, 2H,  $J$  = 7.0 Hz), 4.51 (d, 2H,  $J$  = 13.3 Hz), 4.47 (d, 2H,  $J$  = 13.3 Hz), 4.46 (d, 2H,  $J$  = 13.3 Hz), 4.37 (d, 2H,  $J$  = 6.0 Hz), 4.15 (d, 2H,  $J$  = 6.0 Hz), 3.45-3.40 (m, 6H)

$^{13}\text{C}$  NMR (175 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_4$ ):  $\delta$  157.0, 153.4, 153.3, 141.0, 140.3, 132.1, 131.8, 131.6, 130.3, 129.8, 117.7, 117.1, 116.6, 112.8, 112.5, 87.7, 66.7, 35.8, 35.6, 35.5

HRMS-ES $^+$  ( $m/z$ ) calcd for  $\text{C}_{46}\text{H}_{38}\text{O}_6$ , 709.2560 found 709.2566 ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ ).

## Chiral HPLC of compound **81** (cryptophane-112)

### Conditions :

0.1 mg in 100 $\mu$ L acetonitrile

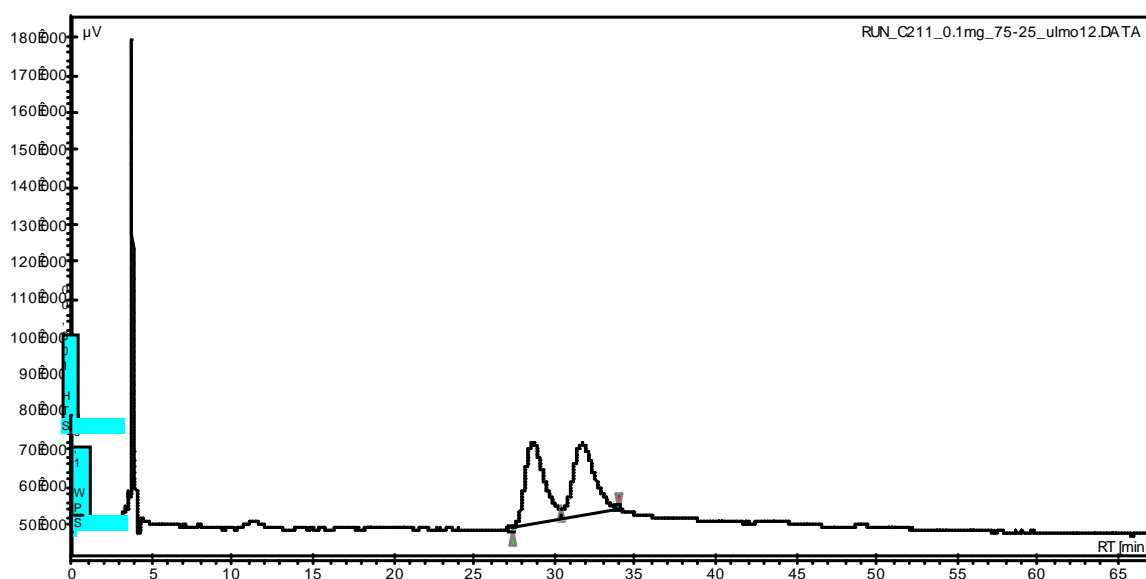
Chiral stationary phase (S,S) Ulmo 25 cm\*4.6 mm 5  $\mu$ m 100 A

75/25 Pentane/Isopropanol, 1ml/min 240 nm (UV)

Injection volume 20  $\mu$ L

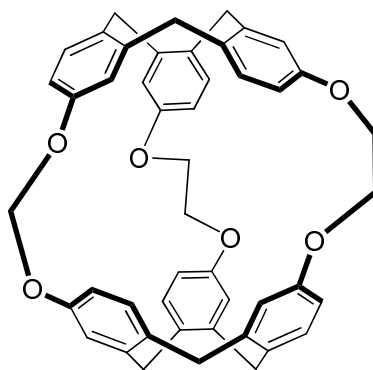
#	Time [Min]	Height [mV]	Area [mV.Min]	Area % [%]
1	28.61	22.1	30.4	50.35
2	31.70	18.9	29.9	49.65
Total		41.1	60.3	100.00

### UV detection





## Compound 82



To a solution of compound **84** (66 mg, 0.096 mmol) in *N,N*-dimethylformamide (DMF, 20 mL) were added cesium carbonate (313 mg, 0.96 mmol) and bromochloromethane (3.1 mL, 48.0 mmol) and the mixture was stirred overnight at 80°C. After filtration and removal of the solvent under reduced pressure, flash column chromatography (dichloromethane/methanol, 0.1:99.9 to 10:90) afforded compound **82** (16 mg, 23%).

White solid

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  7.14-7.05 (m, 6H), 6.75 (s, 4H), 6.68 (s, 2H), 6.60-6.52 (m, 6H), 5.70 (s, 2H), 4.66 (d, 2H,  $J$  = 13.2 Hz), 4.58 (d, 4H,  $J$  = 13.6 Hz), 4.38-4.34 (m, 2H), 4.27-4.23 (m, 2H), 4.14-4.06 (m, 4H), 3.50-3.46 (m, 6H)

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  157.4, 156.9, 154.4, 141.2, 140.8, 140.6, 132.6, 132.1, 131.7, 131.3, 130.9, 130.4, 118.3, 118.2, 116.1, 115.6, 113.5, 112.9, 89.2, 66.2, 66.0, 64.1, 36.5, 36.4, 36.2

HRMS-ES<sup>+</sup> (m/z) calcd for C<sub>47</sub>H<sub>40</sub>O<sub>6</sub>, 723.2726 found 723.2723 ([M+H]<sup>+</sup>).

## Chiral HPLC of compound (cryptophane-122)

### Conditions :

0.1 mg in 100  $\mu$ L acetonitrile

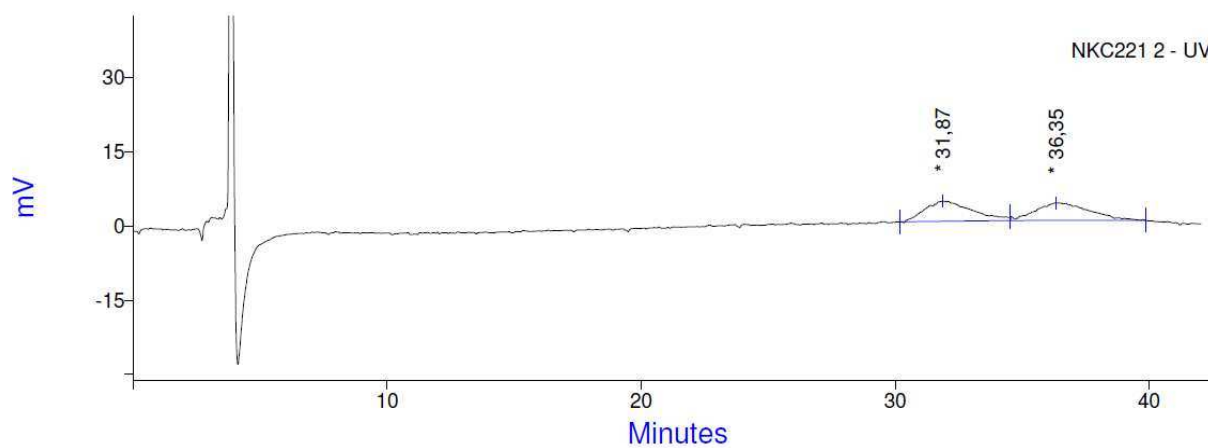
Chiral stationary phase (S,S) Ulmo 25cm\*4.6 mm 5  $\mu$ m 100A

75/25 Hexane/Isopropanol, 1ml/min 240 nm (CD and UV)

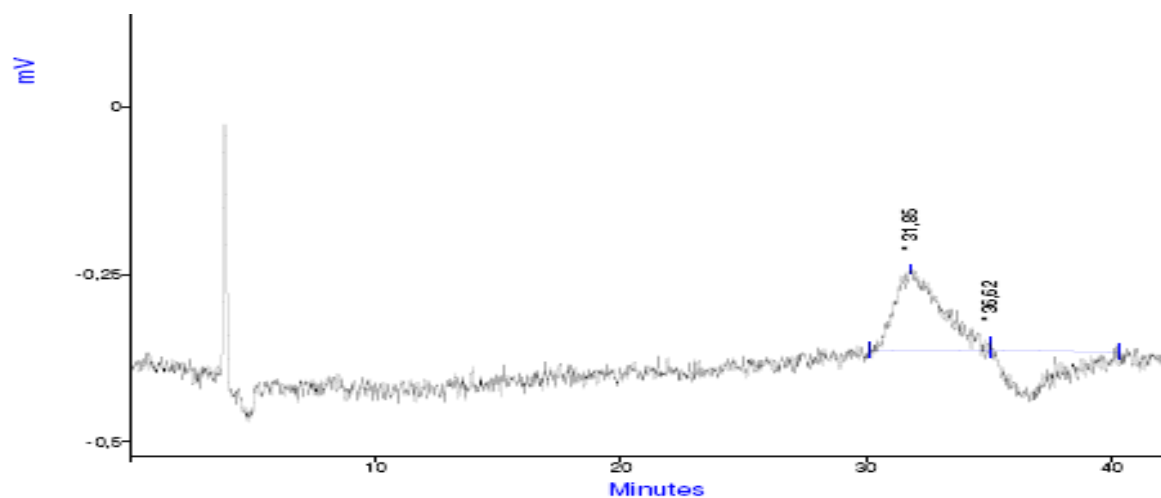
Injection volume 5.0  $\mu$ L

#	Time [Min]	Height [mV]	Area [mV.Min]	Area % [%]
1	31.87	4.07	526.08	50.29
2	36.35	3.59	520.01	49.71
Total		7.66	1046.08	100.00

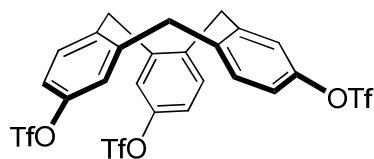
### UV detection



### CD detection



### Compound 90



Cyclotriphenylene **40** (318 mg, 1.0 mmol) is dissolved in 5 mL pyridine. The mixture is cooled to 0 °C and triflic anhydride (846 mg, 3.0 mmol) is added. The reaction is left stirring for 20 min. Water is added and the solution is extracted with dichloromethane. The organic phase is washed with HCl (0.1 M), NaCl and dried over MgSO<sub>4</sub>. Compound **90** is obtained with 75 % yield.

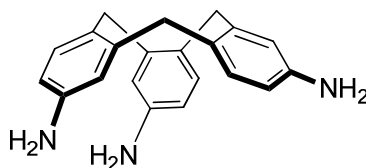
White solid

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  7.43 (d, 3H,  $J$  = 8.4 Hz), 7.26 (d, 3H,  $J$  = 4.8 Hz), 7.90 (dd, 3H,  $J$  = 4.8 Hz,  $J$  = 8.4 Hz), 4.86 (d, 3H,  $J$  = 13.6 Hz), 3.82 (d, 3H,  $J$  = 13.6 Hz)

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  148.4, 140.9, 138.6, 131.9, 122.7, 120.4, 36.5

MS (ESI-TOF)  $m/z$ : 732.1 (100 %, [M+H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>)

### Compound 91



To compound **90** (500 mg, 0.7 mmol) dissolved in anhydrous THF (10 mL), are added cesium carbonate (958 mg, 2.9 mmol), palladium acetate (16 mg, 0.07 mmol), BINAP (65 mg, 0.1 mmol), pyridine (0.56 mL, 7 mmol) and benzophenone imine (457 mg, 2.5 mmol). The solution is heated at 65 °C during 16 hours. The reaction can be monitored by HPLC. Then, THF is removed under reduced pressure and the residue is taken in HCl 2M for 10 minutes, filtrated and purified by reverse phase chromatography (H<sub>2</sub>O/AcCN 95:5 to 0:100) to afford **91** with 16 % yield.

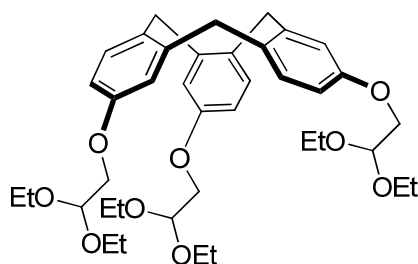
Yellow solid

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta$  7.62 (d, 3H,  $J$  = 8.4 Hz), 7.50 (d, 3H,  $J$  = 2.0 Hz), 7.14 (dd, 3H,  $J$  = 2.0 Hz,  $J$  = 8.4 Hz), 5.06 (d, 3H,  $J$  = 13.6 Hz), 3.88 (d, 3H,  $J$  = 13.6 Hz)

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta$  142.9, 141.3, 133.1, 131.2, 125.6, 122.7, 36.8

MS (ESI-TOF)  $m/z$ : 316.26 (100 %, [M+H]<sup>+</sup>)

## Compound 92



Bromoacetaldehyde (1.92 mL, 12.5 mmol) is added to a solution of cyclotriphenylene **40** (900 mg, 2.8 mmol) and potassium carbonate (1.76 g, 12.7 mmol) in 5 mL DMF. The mixture is heated at 140 °C and stirred overnight. The reaction is monitored by TLC. Water is added and extracted with dichloromethane. The organic phase is washed with NaCl and dried over MgSO<sub>4</sub>. The residue is purified by flash chromatography (cyclohexane/ethyl acetate 85:15) to afford 485 mg of **92** as a white solid with 66 % yield.

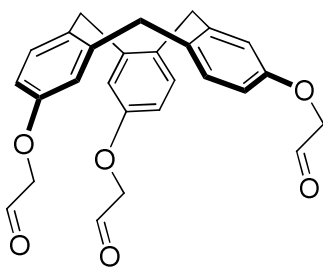
White solid

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  7.25 (d, 3H,  $J$  = 8.8 Hz), 6.90 (d, 3H,  $J$  = 2.8 Hz), 6.65 (dd, 3H,  $J$  = 2.8 Hz,  $J$  = 8.8 Hz), 4.79 (t, 3H,  $J$  = 5.2 Hz), 4.74 (d, 3H,  $J$  = 13.2 Hz), 3.94 (d, 6H,  $J$  = 5.2 Hz), 3.79-3.69 (m, 6H), 3.67-3.55 (m, 9H), 1.25-1.20 (m, 18H)

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  157.2, 141.0, 131.8, 131.0, 116.0, 112.9, 100.4, 68.4, 62.4, 36.5, 15.3

HRMS-ESI ( $m/z$ ) calcd for C<sub>39</sub>H<sub>54</sub>O<sub>9</sub>Na, 689.3666 found 689.3680 ([M+Na]<sup>+</sup>).

### Compound 93



Compound **92** (100 mg, 0.15 mmol) is dissolved in acetone (2.2 mL) and HCl 2M (1.1 mL) and heated at 65 °C for 2 hours. **93** precipitates and can be recovered pure by filtration with 81 % yield.

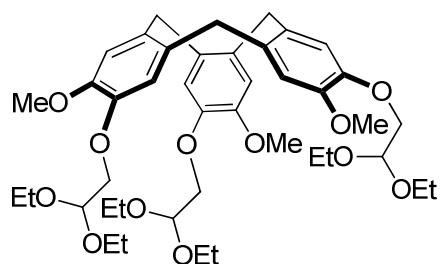
White solid

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO):  $\delta$  9.63 (s, 3H), 7.39 (d, 3H,  $J$  = 8.8 Hz), 7.00 (d, 3H,  $J$  = 2.8 Hz), 6.63 (dd, 3H,  $J$  = 2.8 Hz,  $J$  = 8.8 Hz), 4.75-4.72 (m, 9H), 3.57 (d, 6H,  $J$  = 13.2 Hz)

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO):  $\delta$  199.6, 156.6, 141.8, 132.7, 131.6, 116.1, 112.9, 88.5, 35.6

HRMS-ESI ( $m/z$ ) calcd for C<sub>27</sub>H<sub>23</sub>O<sub>6</sub>, 443.1495 found 443.1501 ([M-H]<sup>-</sup>).

### Compound 94



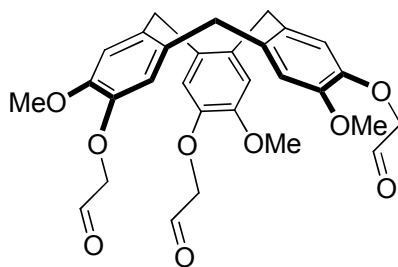
Bromoacetaldehyde (1.51 mL, 9.8 mmol) is added to a solution of CTV **1** (1.0 g, 2.4 mmol) and potassium carbonate (1.35 g, 9.8 mmol) in 5 mL DMF. The mixture is heated at 140 °C and stirred overnight. The reaction is monitored by TLC. Water is added and extracted with dichloromethane. The organic phase is washed with NaCl and dried over MgSO<sub>4</sub>. The residue is purified by flash chromatography (cyclohexane/ethyl acetate 70:30) to afford 501 mg of compound **94** as a white solid with 64 % yield.

White solid

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  6.91 (s, 3H), 6.81 (s, 3H), 4.82 (t, 3H,  $J$  = 5.2 Hz), 4.72 (d, 3H,  $J$  = 14.0 Hz), 4.02-3.98 (m, 6H), 3.81 (s, 9H), 3.79-3.58 (m, 12H), 3.51 (d, 3H,  $J$  = 14.0 Hz), 1.25-1.18 (m, 18H)

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  148.5, 147.0, 132.8, 131.8, 116.5, 114.2, 100.7, 70.53, 62.8, 62.4, 56.3, 36.4, 15.3

### Compound **95**



Compound **94** (100 mg, 0.13 mmol) is dissolved in acetone (1.8 mL) and HCl 2M (0.9 mL) and heated at 65 °C for 2 hours. Water is added and **95** is recovered pure by filtration with 69 % yield.

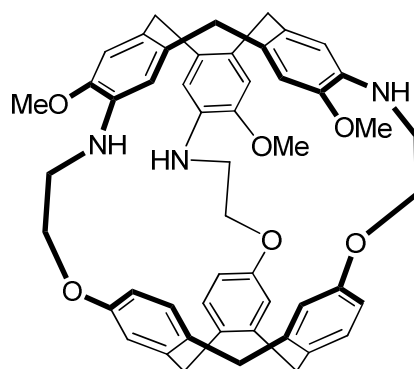
White solid

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ ):  $\delta$  9.76 (s, 3H), 7.10 (s, 3H), 7.09 (s, 3H), 4.79 (d, 3H,  $J$  = 13.6 Hz), 4.64 (s, 6H), 3.81 (s, 9H), 3.57 (d, 6H,  $J$  = 13.6 Hz)

$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ ):  $\delta$  199.5, 148.4, 146.2, 133.8, 132.0, 116.7, 114.1, 74.1, 55.4, 35.3



## Compound **96**



CTV **89** (71 mg, 0.16 mmol) and CTV **93** (65 mg, 0.16 mmol) are dissolved in 45 ml DMSO/MeOH (1:1), then acetic acid 0.1 % (v/v) is added and the mixture is stirred for 30 minutes. Then, NaBH<sub>3</sub>CN (200 mg, 3.2 mmol) is added and the solution is left stirring for an additional 12 hours. The mixture is treated with NaOH 1M and extracted with ethyl acetate. The organic phase is washed with NaCl, dried over MgSO<sub>4</sub> and the residue is purified by flash chromatography (cyclohexane/ethyl acetate 65:35) to afford **96** with 2.7 % yield.

Yellow solid

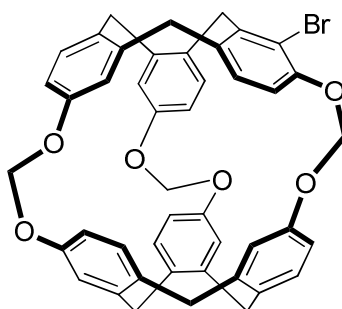
<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 7.07 (d, 3H, *J* = 8.8 Hz), 6.65 (s, 6H), 6.41 (d, 3H, *J* = 8.8 Hz), 6.38 (s, 1H), 4.53 (d, 3H, *J* = 13.2 Hz), 4.43 (d, 3H, *J* = 12.8 Hz), 4.20-4.02 (m, 9H), 3.72 (s, 9H), 3.38 (d, 3H, *J* = 13.2 Hz), 3.23 (m, 3H eclipsed by water), 3.19 (d, 3H, *J* = 12.8 Hz), 3.12 (m, 3H)

<sup>13</sup>C NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 155.6, 145.9, 140.9, 136.7, 132.2, 131.4, 130.4, 128.1, 118.4, 112.2, 111.8, 110.5, 64.1, 55.9, 41.9, 35.2, 35.06

HRMS-ESI (*m/z*) calcd for C<sub>51</sub>H<sub>52</sub>O<sub>6</sub>N<sub>3</sub>, 802.3856 found 802.3871 ([M+H]<sup>+</sup>).

Characterization of compound **96** by <sup>1</sup>H NMR with and without xenon was done using xenon 129 99.5 % CP (453 mL, 4.75 atm at 300 K) purchased from Aldrich.

## Compound 46



N-bromosuccinimide (NBS, 0.63 g, 3.34 mmol) was added to a solution of cryptophane-111 (1.50 g, 2.23 mmol) in chloroform (350 mL) and the mixture was stirred for 24 hours at room temperature. The mixture was washed with water, brine and dried over  $\text{MgSO}_4$ . After filtration and removal of the solvent under reduced pressure, flash column chromatography with cyclohexane/dichloromethane 1:1 to 2:1 afforded compound **7** (0.71 g, 64%).

White solid

$R_f$  = 0.3 (cyclohexane/dichloromethane 2:3)

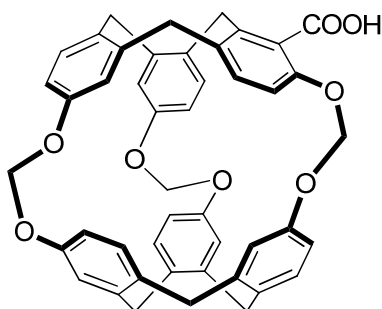
IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ) : 2922, 1500, 1232, 1041, 754

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.96 (bs, 1H,  $J$  = 4Hz), 7.0 (m, 5H), 6.80-6.75 (m, 6H), 6.59 (m, 5H), 5.84 (s, 2H), 5.72-5.65 (m, 4H), 4.58-4.39 (m, 6H), 4.27 (d, 1H,  $J$  = 13.6 Hz), 3.45-3.39 (m, 5H)

$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  153.0, 152.66, 152.61, 149.7, 149.4, 141.2, 140.9, 140.6, 140.4, 139.7, 135.0, 133.6, 132.47, 132.41, 131.7, 131.4, 130.9, 130.7, 130.4, 130.1, 129.8, 129.0, 118.0, 117.9, 117.6, 116.7, 113.8, 113.5, 111.6, 111.4, 111.3, 111.2, 111.1, 87.1, 87.0, 85.6, 36.9, 36.7, 35.7, 35.5, 34.5, 33.0

HRMS-MALDI ( $m/z$ ) calcd for  $\text{C}_{45}\text{H}_{35}\text{BrNaO}_6$ , 773.6598 found 773.6592 ( $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ).

### Compound 98



A solution of compound **7** (0.200 g, 0.260 mmol) in dry tetrahydrofuran (THF, 35 mL) was prepared in a dry flask and cooled to -78 °C. *n*-Butyllithium (*n*BuLi, 0.4mL, 1.13 mmol) was added and the mixture stirred for 5 minutes. The mixture was put under dry CO<sub>2</sub>, stirred for 1 hour at -78 °C and the temperature was increased very slowly. The reaction was stirred for 2 hours at room temperature. The solvent was removed and the reaction was extracted with chloroform (100 mL), washed with water, brine, and dried over MgSO<sub>4</sub>. After removal of the solvent under reduced pressure, flash column chromatography with 100% chloroform stabilized with amylene then 100% chloroform stabilized with ethanol afforded the carboxylic acid cryptophane (38 mg, 27%).

White solid

R<sub>f</sub> = 0.2 (chloroform)

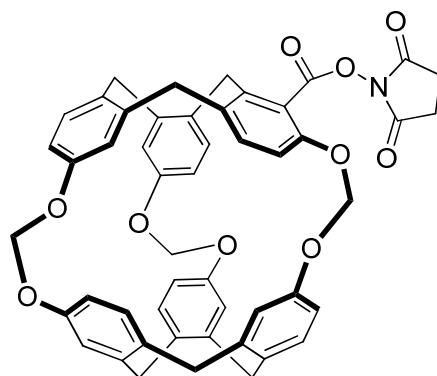
IR (KBr, cm<sup>-1</sup>) : 3400, 2980, 1790, 1501, 1230, 1045

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 11.89 (s, 1H), 7.33 (d, 1H, *J* = 8.4Hz), 7.16-6.57 (m, 16H), 5.95-5.64 (m, 6H), 4.62-4.42 (m, 6H), 3.93 (d, 1H, *J* = 6.4 Hz), 3.50-3.39 (m, 5H),

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 170.2, 153.9, 153.7, 153.6, 153.1, 149.6, 141.4, 141.0, 140.9, 140.8, 140.1, 135.7, 133.5, 132.5, 132.1, 131.9, 131.7, 131.3, 130.6, 130.0, 129.8, 129.7, 126.1, 118.9, 118.1, 117.9, 117.7, 117.5, 117.0, 112.2, 111.7, 111.6, 111.5, 111.3, 110.7, 85.9, 85.6, 85.5, 35.7, 35.5, 35.4, 35.3, 31.5

HRMS-ESI (m/z) calcd for C<sub>46</sub>H<sub>36</sub>O<sub>8</sub>, 716.2410 found 716.2419 ([M-H]<sup>-</sup>).

### Compound 99



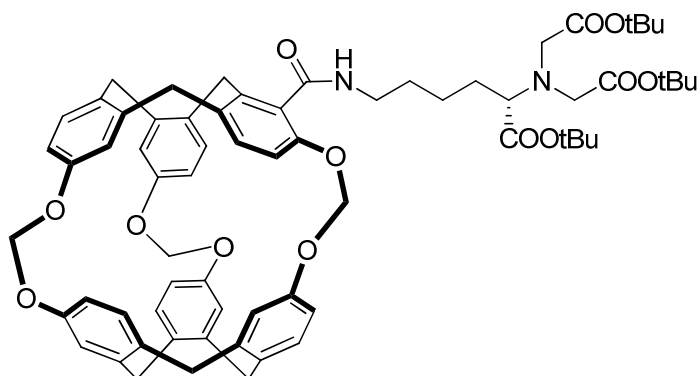
To a solution of cryptophane **98** (50 mg, 0.07 mmol) in anhydrous dichloromethane (1 mL), EDCI (21 mg, 0.1 mmol) and *N*-hydroxysuccinimide (20 mg, 0.1 mmol) were added and left 12 hours at room temperature under nitrogen. The reaction mixture is then washed with water, dried on  $\text{MgSO}_4$  and evaporated under reduced pressure. Purification by column chromatography on silica gel (dichloromethane / methanol 99,5 : 0,5) affords compound **99** with 70 % yield.

White solid

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.01-6.99 (m, 6H), 6.79-6.73 (m, 6H), 6.65-6.58 (m, 5H), 5.75-5.68 (m, 6H), 4.52-4.49 (m, 6H), 4.21 (d, 1H,  $J = 14.3$  Hz), 3.45-3.40 (m, 5H), 2.95-2.90 (m, 4H)

MS (ESI-TOF)  $m/z$ : 831.28 (100 %,  $[\text{M} + \text{H}_2\text{O} + \text{H}]^+$ )

Compound **104**



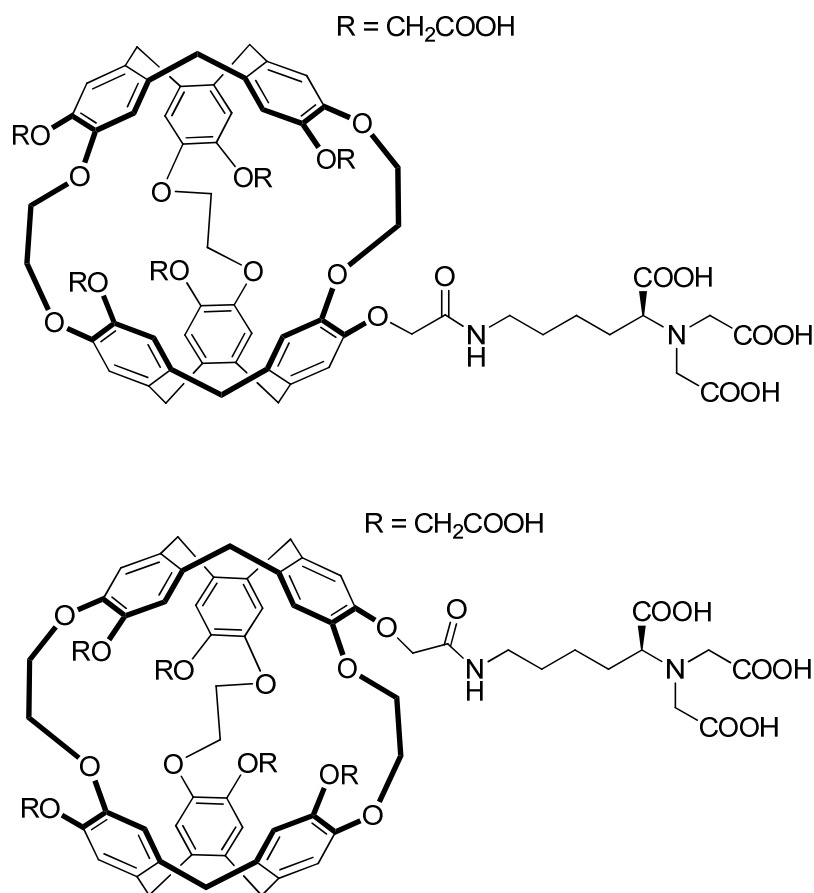
To a solution of cryptophane **99** (8 mg, 9.8  $\mu\text{mol}$ ) in 1 mL of dimethylformamide, compound **103** (6 mg, 13.9  $\mu\text{mol}$ ) and 20  $\mu\text{L}$  triethylamine are added. The mixture is stirred overnight then evaporated and purified by HPLC to give 3 mg of **104** with 26 % yield.

White solid

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.08-6.47 (m, 17H), 5.85-5.61 (m, 6H), 4.61-4.36 (m, 6H), 3.60-3.29 (m, 11 H), 2.05-1.20 (m, 35 H)

MS (ESI-TOF)  $m/z$ : 1129.68 (100 %,  $[\text{M}+\text{H}]^+$ )

### Compound 105



N-hydroxysuccinimide (2.5 mg, 22  $\mu\text{mol}$ ) and N'-ethyl-Ndimethylaminopropylcarbodiimide (4.5 mg, 24  $\mu\text{mol}$ ) were added under argon atmosphere to a stirred solution of **35** (25 mg, 22  $\mu\text{mol}$ ) in DMSO (0.5 mL). The mixture was stirred for 5 hours at room temperature. Then a solution of NTA linker (11.0 mg, 43  $\mu\text{mol}$ ) dissolved in DMSO (0.1mL) and triethylamine were added. The solution was then stirred for an additional 16 hours at room temperature. The excess of triethylamine was removed under reduced pressure. The solution was then directly injected for purification on preparative HPLC chromatography (Phenomenex Luna column. Size: 150x21.2, flow 21.2 mL/min, gradient: 95/5 to 50/50 H<sub>2</sub>O/AcCN + 1% HCOOH) to give **105** (3.8 mg, 12 %) as a white solid. From this experiment 4.2 mg (16 %) of the starting material were also recovered.

Characterizations are detailed for each diastereomer.

## Xenon experiments with compound **105**

$^{129}\text{Xe}$  NMR spectra and complementary analyses (SPINOE, diffusion) were done at the Laboratoire de Structure et Dynamique par Résonance Magnétique (LSDRM) by Patrick Berthault and his team. The following protocole was therefore fully elaborated in his lab.

86%-enriched  $^{129}\text{Xe}$  from Cortecnet was polarized by spin-exchange optical pumping of rubidium<sup>144</sup> by using a recently installed homebuilt setup based on laser diodes. The photons exiting from a duo-FAP system (2 x 30W) and circular polarizer from Coherent illuminated a Pyrex cell that was placed at the center of a 100G magnetic field. Because the bandwidth of the laser diodes was about 2 nm, pressure-broadening was necessary. Therefore, the pressure in the cell rose 3 atm (measured at room temperature) with a mixture of 2%Xe/10% N<sub>2</sub>/88% He. The pumping cell was heated for two minutes to 410 K by using a flow of hot N<sub>2</sub> in an external envelope, in a fashion similar to what was developed for our previous experimental setup.<sup>145</sup>

Then xenon was condensed in a cold finger inside a 3kG solenoid immersed in liquid nitrogen, and thus it was separated from helium and nitrogen. The average polarization value with this experimental setup was 15%, measured for the gaseous phase in the NMR spectrometer.

For the experiments with the biosensor, hyperpolarized xenon was introduced on top of the solution in the upper part of the screwed NMR tube by using a vacuum line in the fringe field of the NMR magnet. Then a vigorous shaking of the tube followed by a 10 s delay ensures complete dissolution and equilibration of both gaseous and dissolved phases.

Each NMR tube received about 1 atm of hyperpolarized xenon on top of the solution.

The 32 x 32 point images (781 x 781 mm per pixel) were obtained by using a gradient echo sequence employing a Gaussian pulse of 8 ms without slice selection, with an echo time of 4.7 ms and a repetition time of 25 ms.

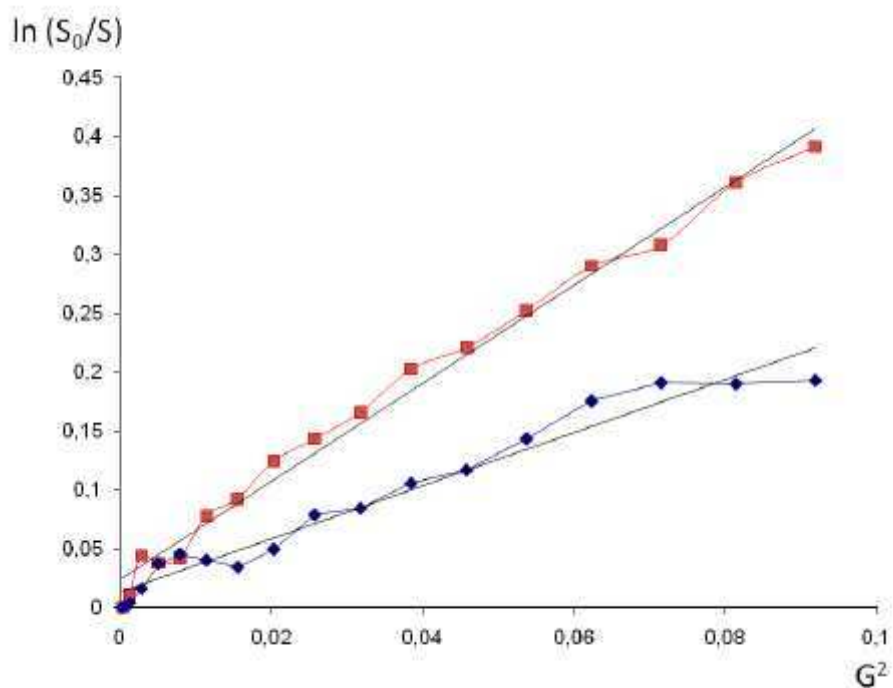
The  $^{129}\text{Xe}$  spectra and the images shown were recorded at 11.7 T and 293 K with HNX-TBI and dual  $^{129}\text{Xe}$ -1H 5 mm Bruker probe heads for the former and a micro-5 Bruker probe head for the latter. The signals are referenced with respect to xenon gas extrapolated to zero pressure.

---

<sup>144</sup> T. G. Walker, W. Happer, *Rev. Mod. Phys.* **1997**, 69, 629

<sup>145</sup> H. Desvaux, T. Gautier, G. Le Goff, M. Péro, P. Berthault, *Eur. Phys. J. D* **2000**, 12, 289

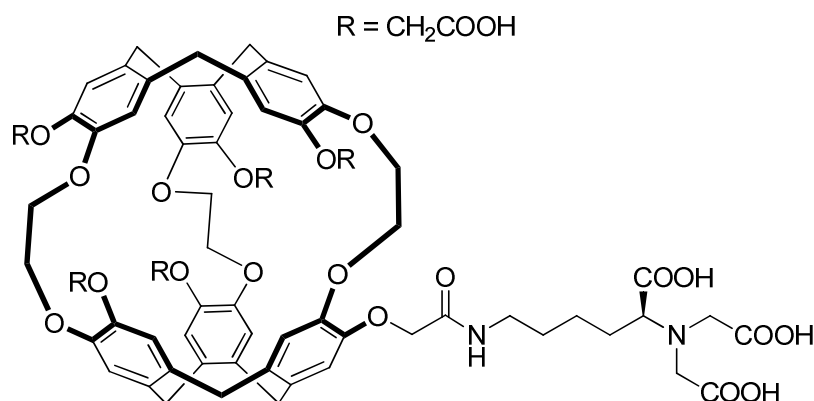
Diffusion experiments on compound **105** (run by Patrick Berthault and his team)



$^1\text{H}$  self-diffusion data obtained at 700 MHz, 298K with a stimulated spin echo sequence (sine gradients of duration 1 ms, inter-gradient delay 150 ms). The red squares were obtained for the sensor **105** in the absence of Zn, the blue diamonds for **1** with 50%  $Zn^{2+}$ .



### Compound **105a**



N-hydroxysuccinimide (2.5 mg, 22  $\mu\text{mol}$ ) and N'-ethyl-Ndimethylaminopropylcarbodiimide (4.5 mg, 24  $\mu\text{mol}$ ) were added under argon atmosphere to a stirred solution of PP-**35** (25 mg, 22  $\mu\text{mol}$ ) in DMSO (0.5 mL). The mixture was stirred for 5 hours at room temperature. Then a solution of NTA linker (11.0 mg, 43  $\mu\text{mol}$ ) dissolved in DMSO (0.1mL) and triethylamine were added. The solution was then stirred for an additional 16 hours at room temperature. The excess of triethylamine was removed under reduced pressure. The solution was then directly injected for purification on preparative HPLC chromatography (Phenomenex Luna column. Size: 150x21.2, flow 21.2 mL/min, gradient: 95/5 to 50/50  $\text{H}_2\text{O}/\text{AcCN}$  + 1%  $\text{HCOOH}$ ) to give **105a** (4.8 mg, 16 %) as a white solid. From this experiment 5.6 mg (22 %) of the starting material were also recovered.

White solid

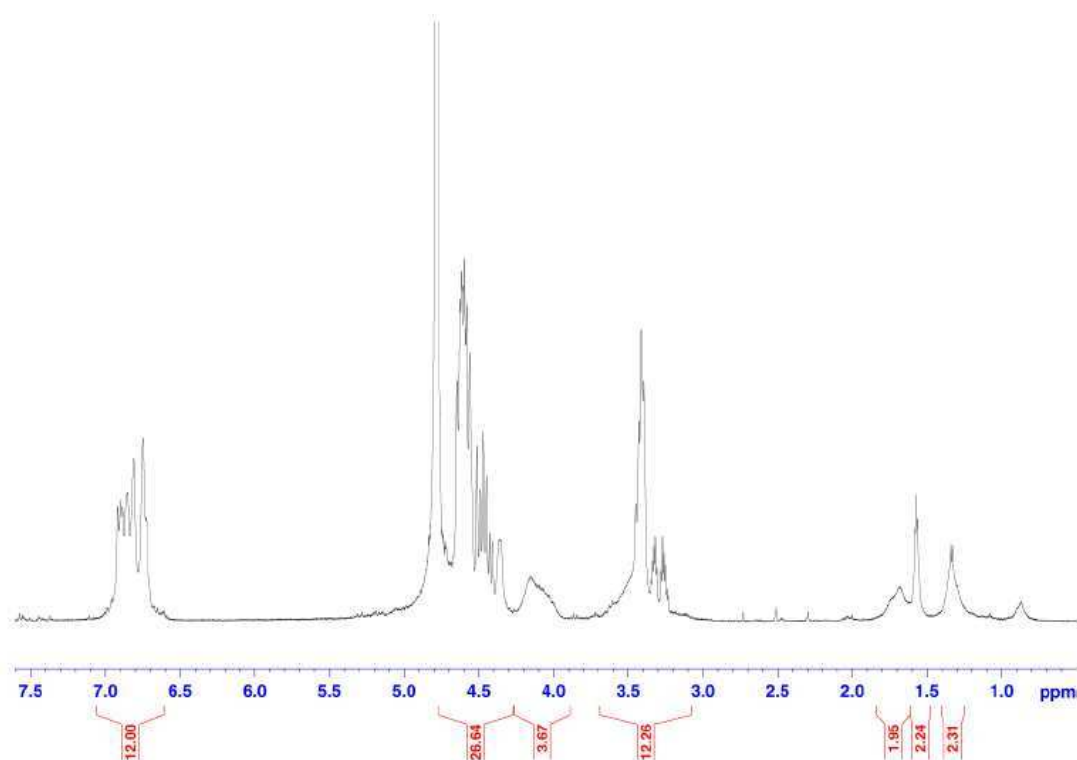
$^1\text{H}$  NMR (700 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  6.95-6.70 (m, 12H), 4.72-4.29 (m, 27H), 4.29-3.93 (m, 4H), 3.71-3.11 (m, 12H), 1.86-1.62 (m, 2H), 1.62-1.47 (m, 2H), 1.47-1.20 (m, 2H).

$^{13}\text{C}$  DEPT NMR (175 MHz,  $\text{D}_2\text{O}/\text{NaOD}$ ,  $\text{pD}=8$ ):  $\delta$  118.5, 71.2, 60.6, 43.3, 39.2, 32.9, 28.1

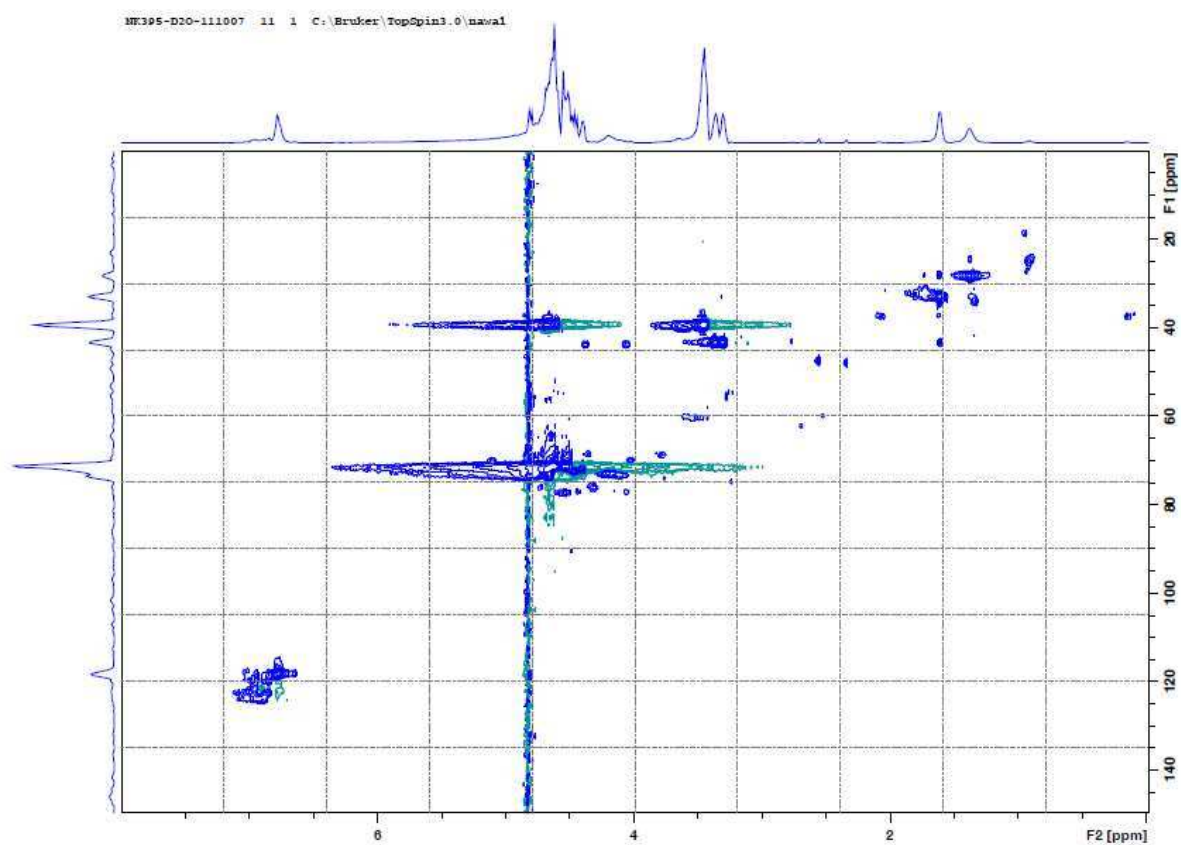
The HSQC NMR experiment is also in good agreement with the structure (see below).

HRMS- $\text{ES}^+$  ( $m/z$ ) calcd for  $\text{C}_{70}\text{H}_{71}\text{N}_2\text{O}_{29}$ , 1403.4143 found 1403.4155 ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ ).

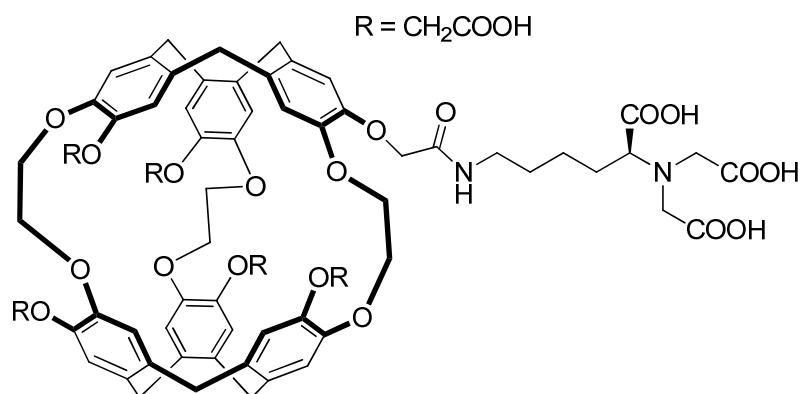
$^1\text{H}$  NMR of compound **105a**



HSQC of compound **105a**



### Compound 105b



N-hydroxysuccinimide (2.5 mg, 22  $\mu\text{mol}$ ) and N'-ethyl-Ndimethylaminopropylcarbodiimide (4.5 mg, 24  $\mu\text{mol}$ ) were added under argon atmosphere to a stirred solution of PP-35 (25 mg, 22  $\mu\text{mol}$ ) in DMSO (0.5 mL). The mixture was stirred for 5 hours at room temperature. Then a solution of NTA linker (11.0 mg, 43  $\mu\text{mol}$ ) dissolved in DMSO (0.1mL) and triethylamine were added. The solution was then stirred for an additional 16 hours at room temperature. The excess of triethylamine was removed under reduced pressure. The solution was then directly injected for purification on preparative HPLC chromatography (Phenomenex Luna column. Size: 150x21.2, flow 21.2 mL/min, gradient: 95/5 to 50/50  $\text{H}_2\text{O}/\text{AcCN}$  + 0.1% $\text{HCOOH}$ ) to give **105a** (3.9 mg, 12 %) as a white solid. From this experiment 4.2 mg (16 %) of the starting material were also recovered.

White solid

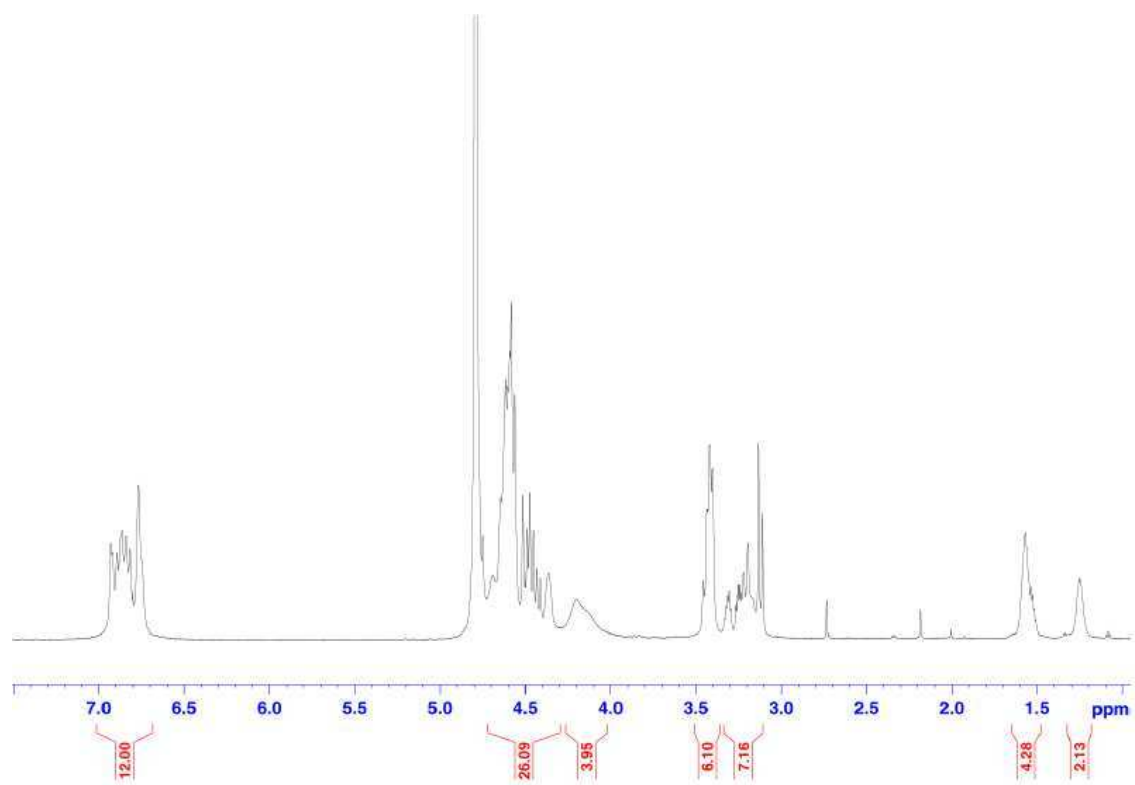
$^1\text{H}$  NMR (700 MHz,  $\text{D}_2\text{O}/\text{NaOD}$ ,  $\text{pD}=13$ ):  $\delta$  6.96-6.69 (m, 12H), 4.72-4.30 (m, 26H), 4.30-3.98 (m, 4H), 3.51-3.35 (m, 6H), 3.35-3.06 (m, 7H), 1.64-1.48 (m, 4H), 1.31-1.18 (m, 2H)

$^{13}\text{C}$  DEPT NMR (175 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  118.4, 71.4, 61.0, 43.7, 39.6, 33.3, 28.2

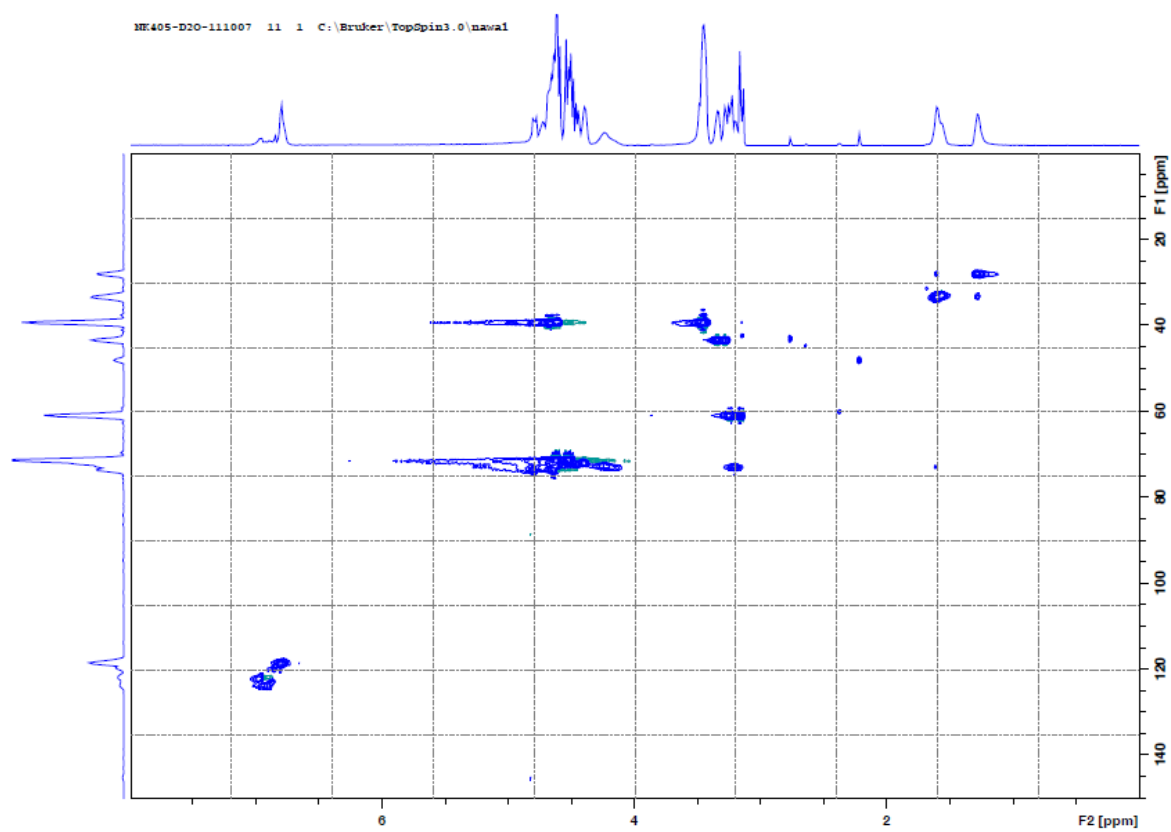
The HSQC NMR experiment is also in good agreement with the structure (see below).

HRMS-ES $^+$  (m/z) calcd for  $\text{C}_{70}\text{H}_{71}\text{N}_2\text{O}_{29}$ , 1403.4143 found 1403.4091( $[\text{M}+\text{H}]^+$ )

$^1\text{H}$  NMR of compound **105b**

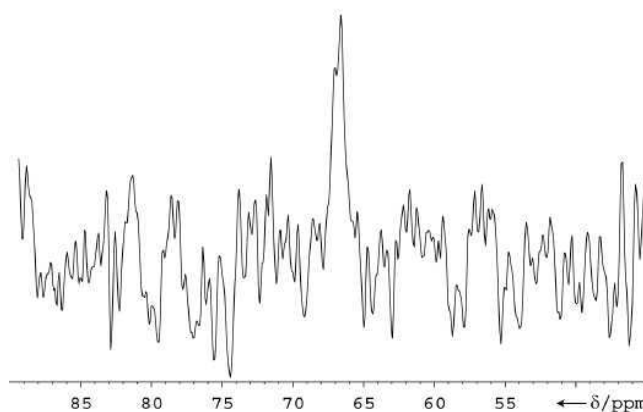


HSQC of compound **105b**



## Limit of detection of compound **105b**

The limit of detection was assessed by Patrick Berthault and his team (LSDRM).



$^{129}\text{Xe}$  NMR spectrum (11.7 Tesla – 293K) of xenon encapsulated in cryptophane **105b** at a concentration of 194 nM in the presence of 50%  $\text{Zn}^{2+}$ . For this spectrum, the sequence {500  $\mu\text{s}$  Gaussian pulse – Acquisition} has been repeated 3584 times with an interscan delay of 47 ms. This experiment, performed with a unique addition of xenon into solution introduced by shaking, required only 2 min 50 s. The xenon polarization was estimated to 0.15.

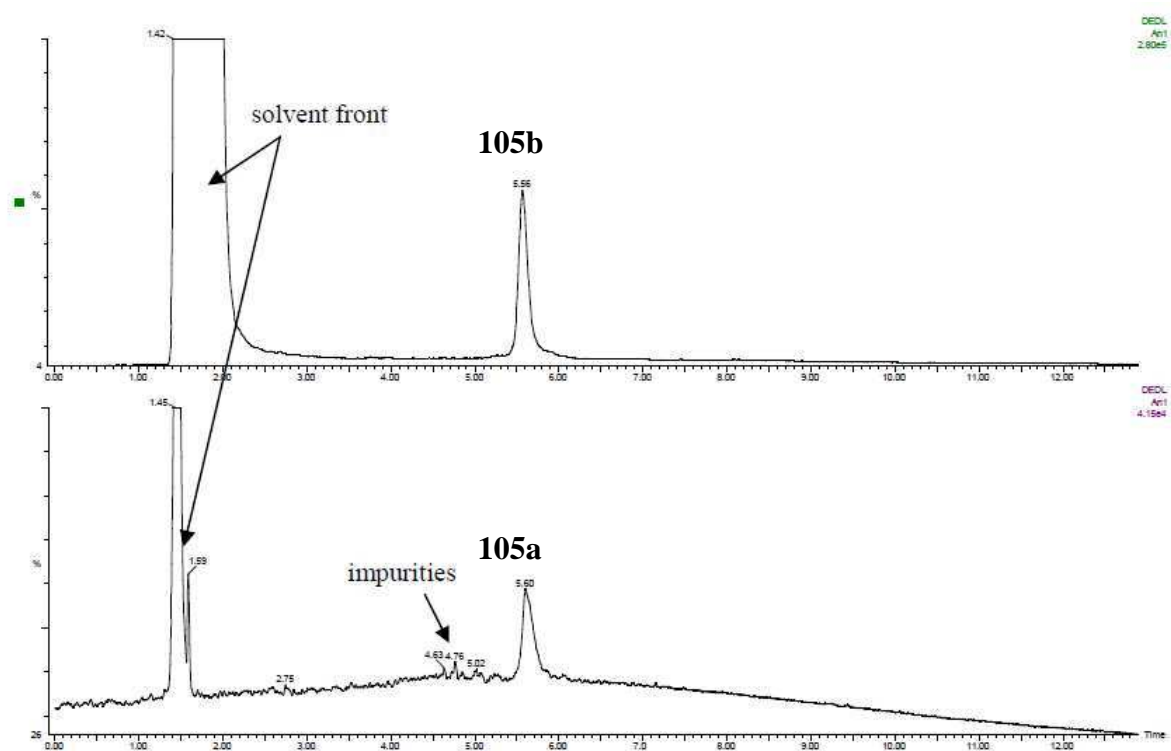
## HPLC chromatograms of **105a** and **105b**

Purity checked on C18 Column

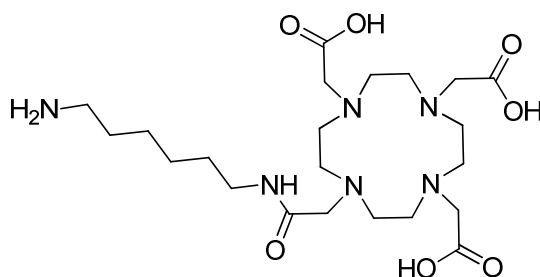
Gradient: 95/5 to 0/100 H<sub>2</sub>O/AcCN + 0.1% HCOOH.

Retention time for **105a**: 5.60 min.

Retention time for **105b**: 5.56 min.



### Compound 120



To a solution of deprotonated cyclen **122** (210 mg, 0.41 mmol) dissolved in acetonitrile (6 mL) are added potassium carbonate (84 mg, 0.61 mmol) and linker **124** (138 mg, 0.41 mmol). The mixture is stirred overnight, then filtrated and evaporated under reduced pressure. The residue is then stirred in trifluoroacetic acid for 12 hours, the solvent is evaporated by adding dichloromethane and the mixture is purified by HPLC on HILIC column (Size: 250x19, gradient: 100:0 to 50:50 AcCN/H<sub>2</sub>O + 0.1% HCOOH).

#### **Peak 1**

Colourless oil

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  3.94-3.70 (m, 8H), 3.42-3.16 (m, 18H), 2.98 (t, 2H,  $J = 7.2$  Hz), 1.71-1.60 (m, 2H), 1.58-1.50 (m, 2H), 1.47-1.32 (m, 4H)

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  165.7, 55.3, 50.0 (b), 39.4, 39.3, 28.0, 26.5, 25.4, 25.1

MS (ESI-TOF)  $m/z$ : 503.7 (100 %, [M+H]<sup>+</sup>)

#### **Peak 2**

Colourless oil

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  3.81 (dd, 4H,  $J = 16$ Hz,  $J = 24$ Hz), 3.58-3.38 (m, 12H), 3.16-2.94 (m, 12H), 1.69-1.62 (m, 2H), 1.54-1.47 (m, 2H), 1.40-1.32 (m, 4H)

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  166.7, 55.8, 48.5 (b), 39.4, 39.3, 27.9, 26.5, 25.4, 25.0

MS (ESI-TOF)  $m/z$ : 503.7 (100 %, [M+H]<sup>+</sup>)

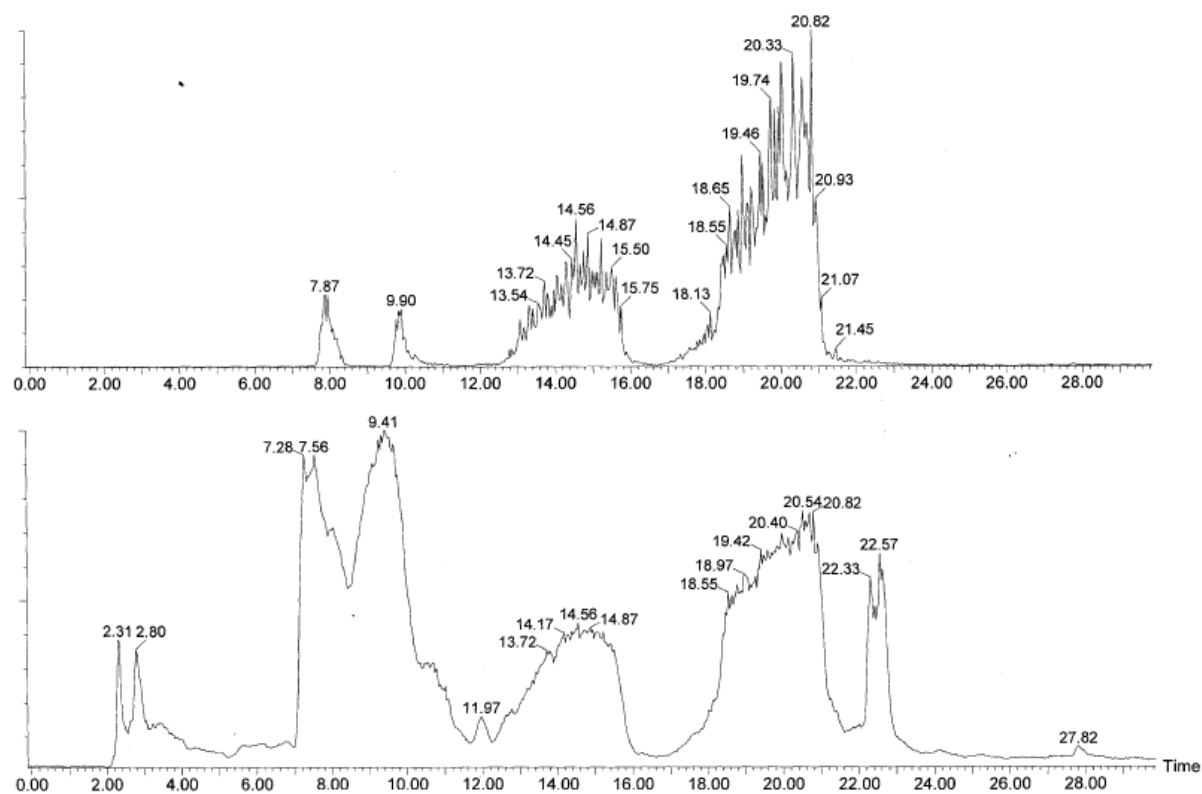
## HPLC chromatograms of compound **120**

HPLC profiles on HILIC column

Gradient: AcCN/H<sub>2</sub>O + 0.1% HCOOH 100:0 to 50:0

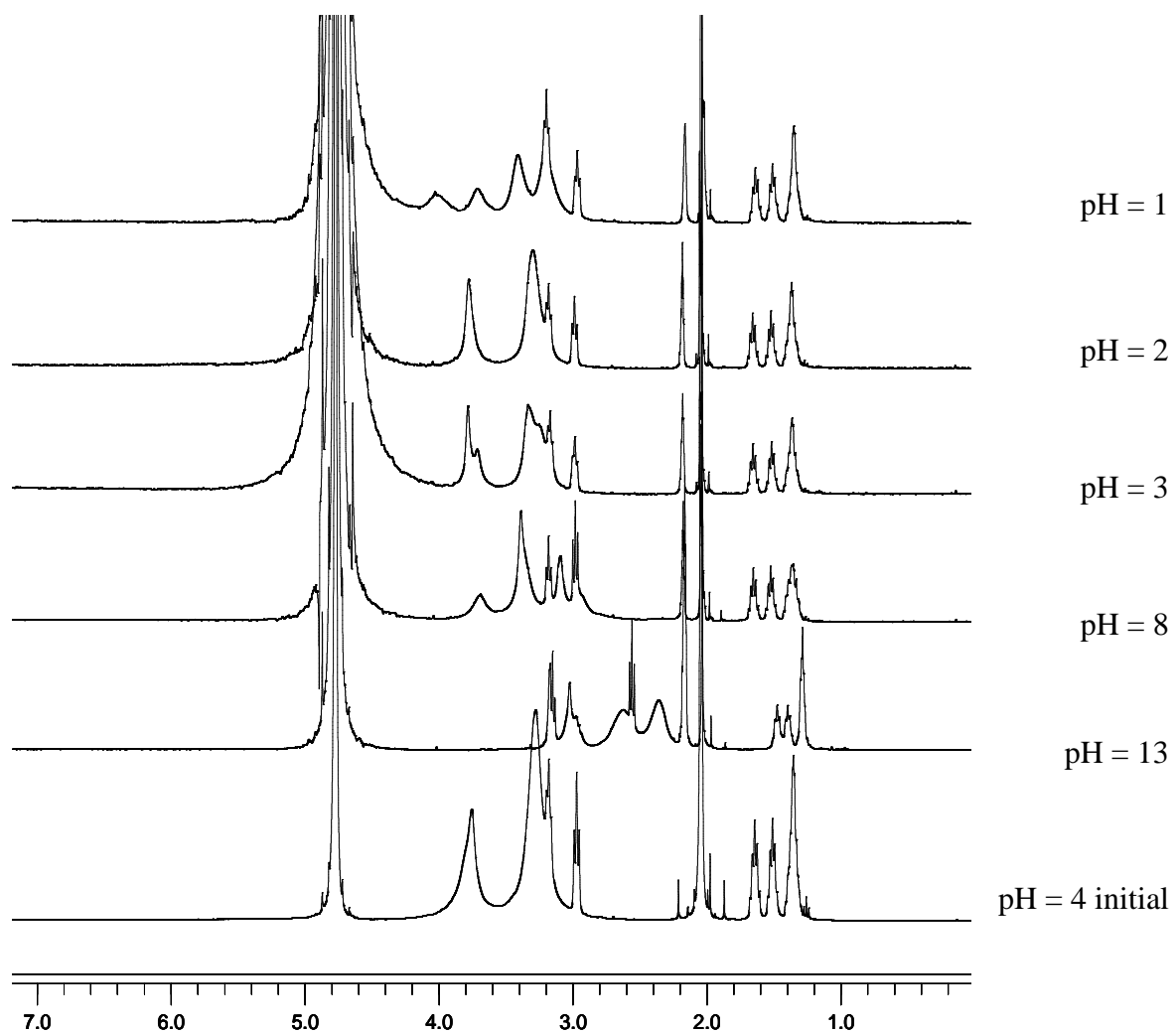
(up) obtained by searching for  $[M+H]^+ = 503.7$

(down) obtained by ES<sup>+</sup> ionization

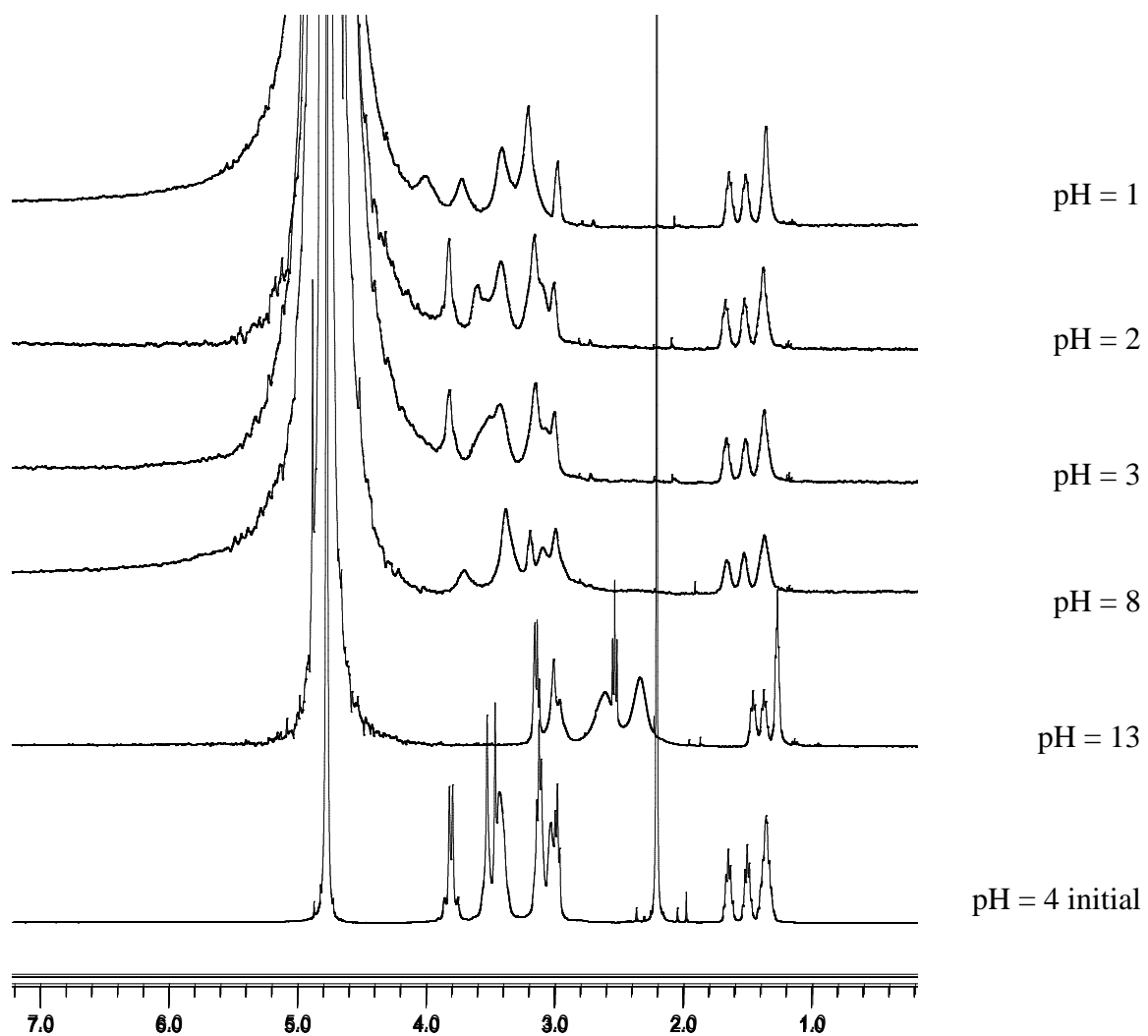




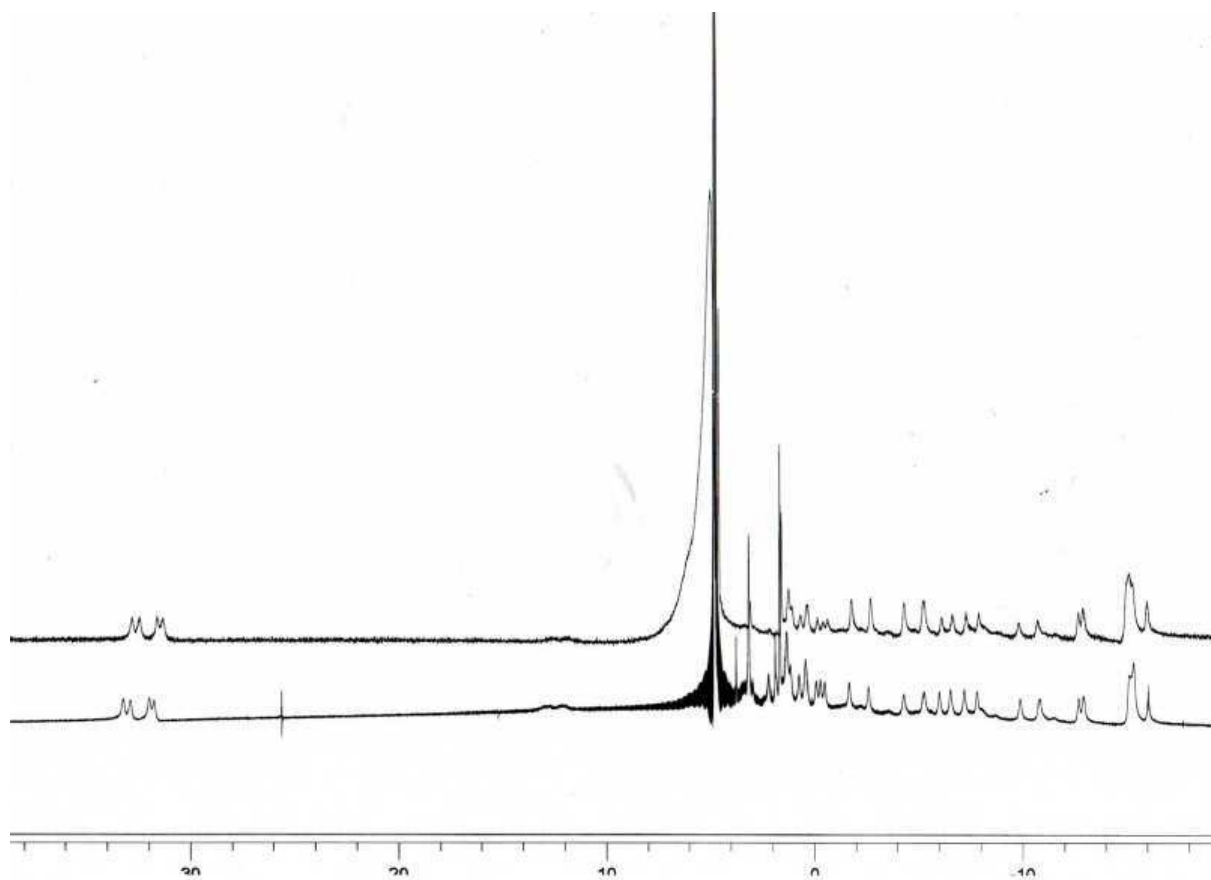
$^1\text{H}$  NMR pf compound **120** peak 1 at different pH



$^1\text{H}$  NMR pf compound **120** peak 2 at different pH

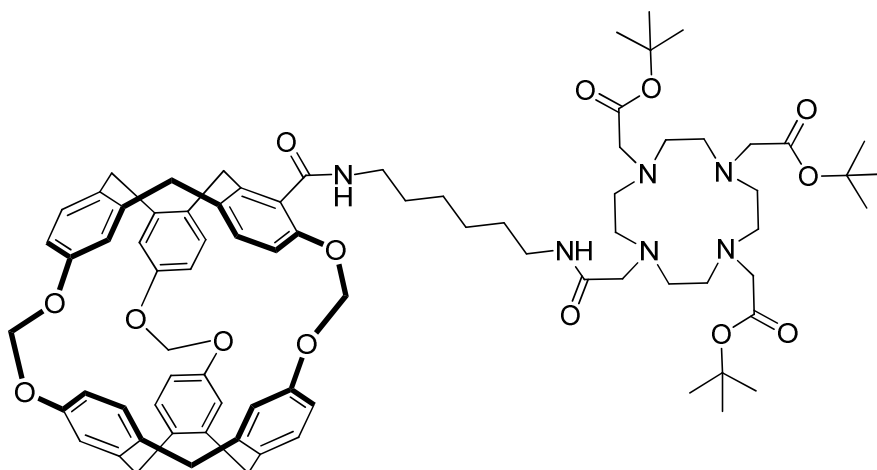


$^1\text{H}$  NMR of Europium complexes of compound **120** peak 1 (top) and peak 2 (bottom)



The spectrum expands from -20 to 40 ppm.

### Compound 133



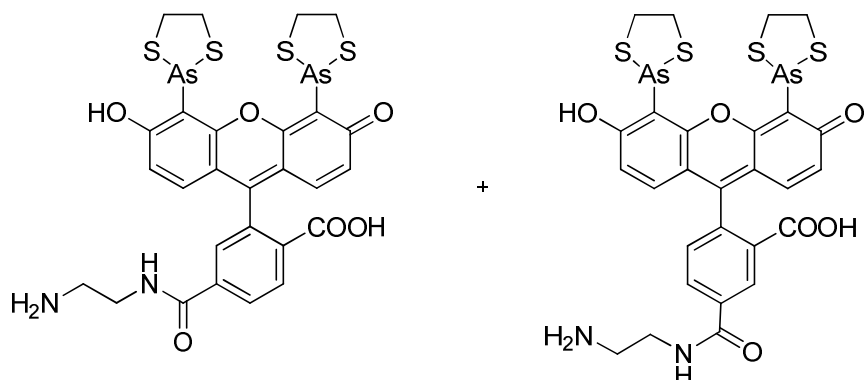
Cryptophane **98** (39 mg, 54  $\mu\text{mol}$ ), PyBOP (83 mg, 163  $\mu\text{mol}$ ), ligand **126** (40 mg, 60  $\mu\text{mol}$ ) and DIEA (0.2 mL, 1.09 mmol) are stirred in 4 mL of dimethylsulfoxide overnight. Water is added and the mixture is extracted with chloroform. The organic phase is dried over  $\text{MgSO}_4$  and evaporated under reduced pressure. HPLC purification affords 20 mg of compound **133** with 26 % yield.

White solid

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.35-7.34 (m, 2H), 7.08-6.93 (m, 6H), 6.82-6.78 (m, 3H), 6.66-6.59 (m, 5H), 6.48 (s, 1H), 5.86-5.62 (m, 6H), 4.60-4.39 (m, 6H), 4.14-4.12 (m, 1H), 3.73-3.68 (m, 4H), 3.50-3.10 (m, 17H), 3.03-2.96 (m, 4H), 2.82-2.78 (m, 4H), 1.86-1.41 (m, 39H)

MS (ESI-TOF)  $m/z$ : 1369.87 (100 %,  $[\text{M}+\text{H}]^+$ )

Compound **146** and **147**

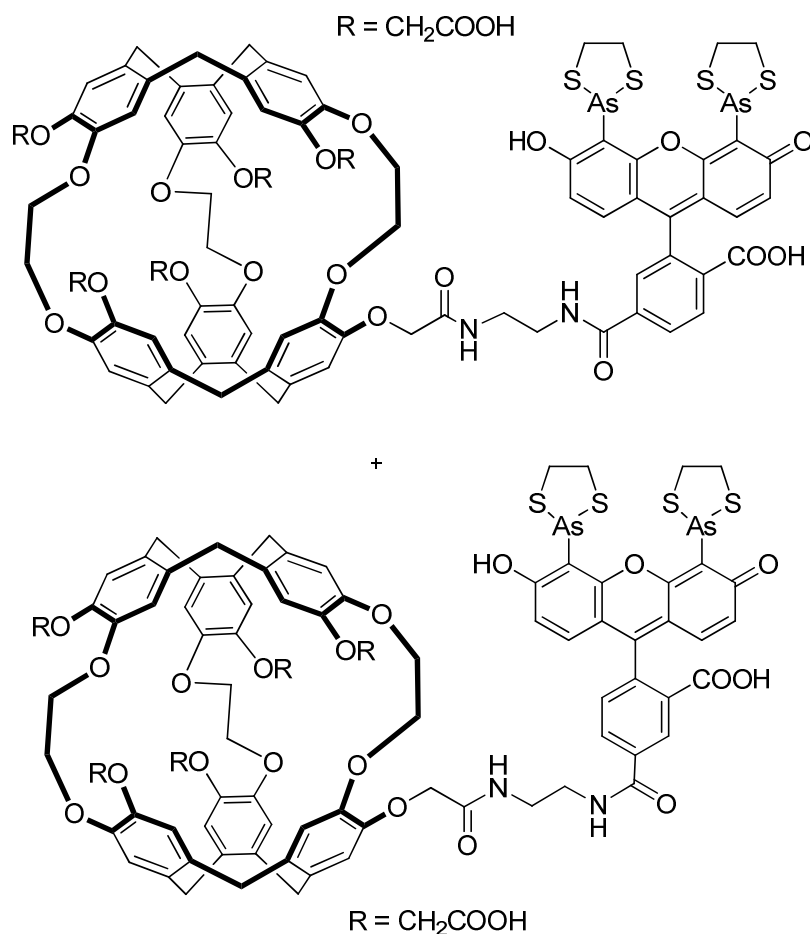


To a solution of CrAsH isomers **144** and **145** (70 mg, 0.10 mmol) in THF (15 mL), are added DIC (20  $\mu$ L, 0.13 mmol) and NHS (15 mg, 0.13 mmol). The mixture is stirred for 3 hours (the reaction can be monitored by TLC or HPLC) then ethylene diamine (66  $\mu$ L, 1.0 mmol) is added. This solution turns from orange to bright pink and a precipitate appears. The solvent is evaporated and the residue is passed through a C18 silica patch. It is first rinsed with water to remove the excess of ethylene diamine, then the rest of the mixture is eluted with acetonitrile. The fraction is evaporated and gives 45 mg of red solid used as is for the next reaction.

By HPLC, we estimated the amount of **146** and **147** obtained at around 30 mg (~ 40 % yield).

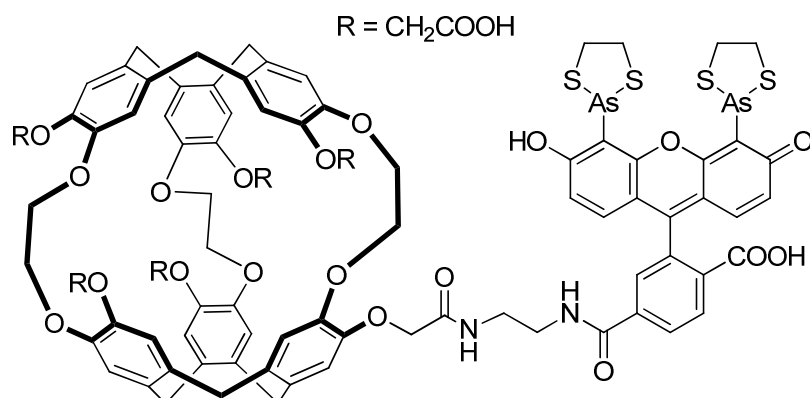
MS (ESI-TOF)  $m/z$ : 750.7 (100 %,  $[M+H]^+$ )

Compound **137** and **148**



N-hydroxysuccinimide (5.0 mg, 43  $\mu\text{mol}$ ) and N'-ethyl-Ndimethylaminopropylcarbodiimide (9.0 mg, 47  $\mu\text{mol}$ ) were added under argon atmosphere to a stirred solution of **35** (50 mg, 43  $\mu\text{mol}$ ) in DMSO (0.5 mL). The mixture was stirred for 5 hours at room temperature. Then a solution of crude **146** and **147** (45.0 mg) dissolved in DMSO (0.45 mL) and triethylamine were added. The solution was then stirred for an additional 16 hours at room temperature. The excess of triethylamine was removed under reduced pressure. The solution was then directly injected for purification on preparative HPLC chromatography (Luna PFP column. Size: 150x21, gradient: 95/5 to 20/80  $\text{H}_2\text{O}/\text{AcCN}$  + 0.1 %HCOOH) to give **137** (7.8 mg, 10 %) and **148** (4.8 mg, 6 %) as orange solids.

### Compound **137**

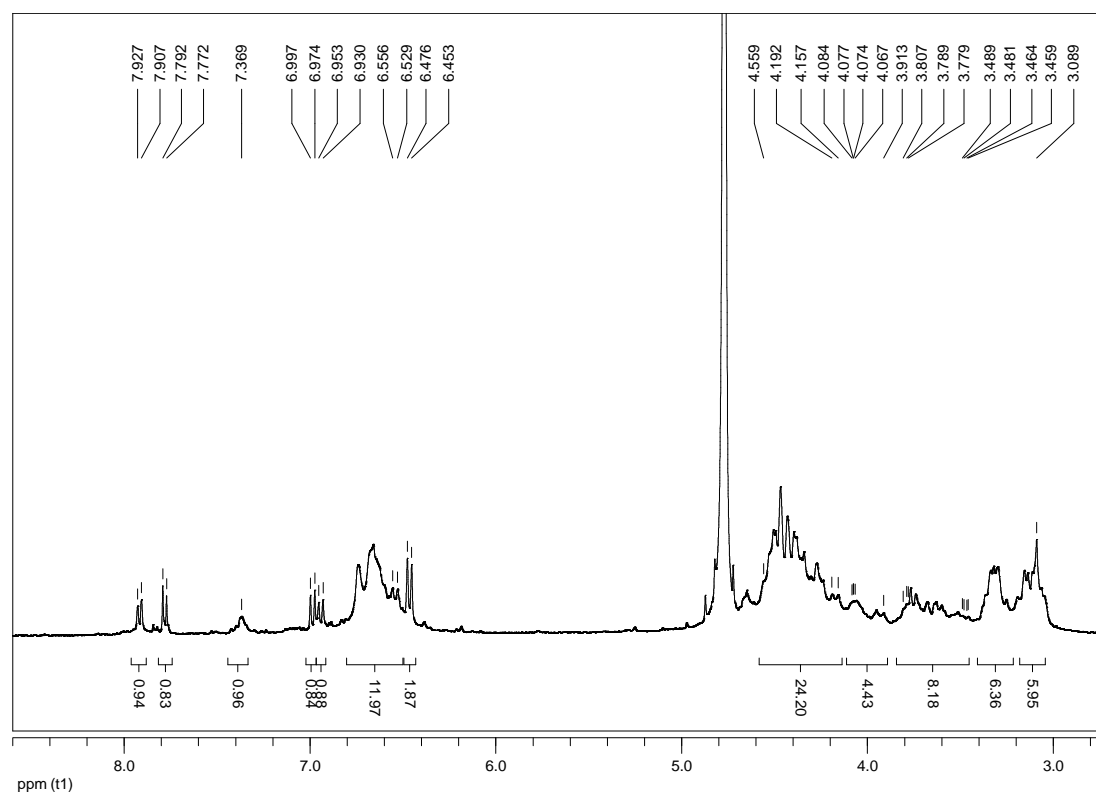


Orange solid

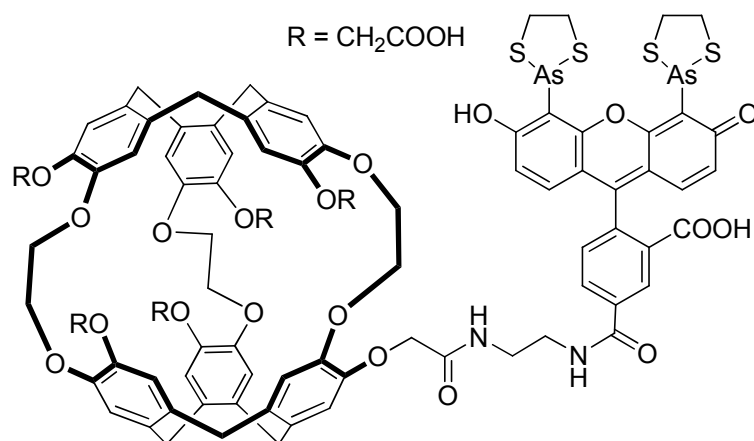
$^1\text{H}$  NMR (700 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  7.91 (d, 1H,  $J = 8.0$  Hz), 7.78 (d, 1H,  $J = 8.0$  Hz), 7.37 (s, 1H), 6.98 (d, 1H,  $J = 9.2$  Hz), 6.94 (d, 1H,  $J = 9.2$  Hz), 6.76-6.48 (m, 12H), 6.46 (d, 2H,  $J = 9.2$  Hz), 4.60-4.18 (m, 24H), 4.16-3.89 (m, 4H), 3.84-3.46 (m, 8H), 3.37-3.22 (m, 6H), 3.21-3.03 (m, 6H)

HRMS-ES $^-$  (m/z) calcd for  $\text{C}_{87}\text{H}_{75}\text{N}_2\text{O}_{29}\text{S}_4\text{As}_2$ , 1889.1770 found 1889.1797 ( $[\text{M}-\text{H}]^-$ ).

$^1\text{H}$  NMR of compound **137**



## Compound **148**



Orange solid

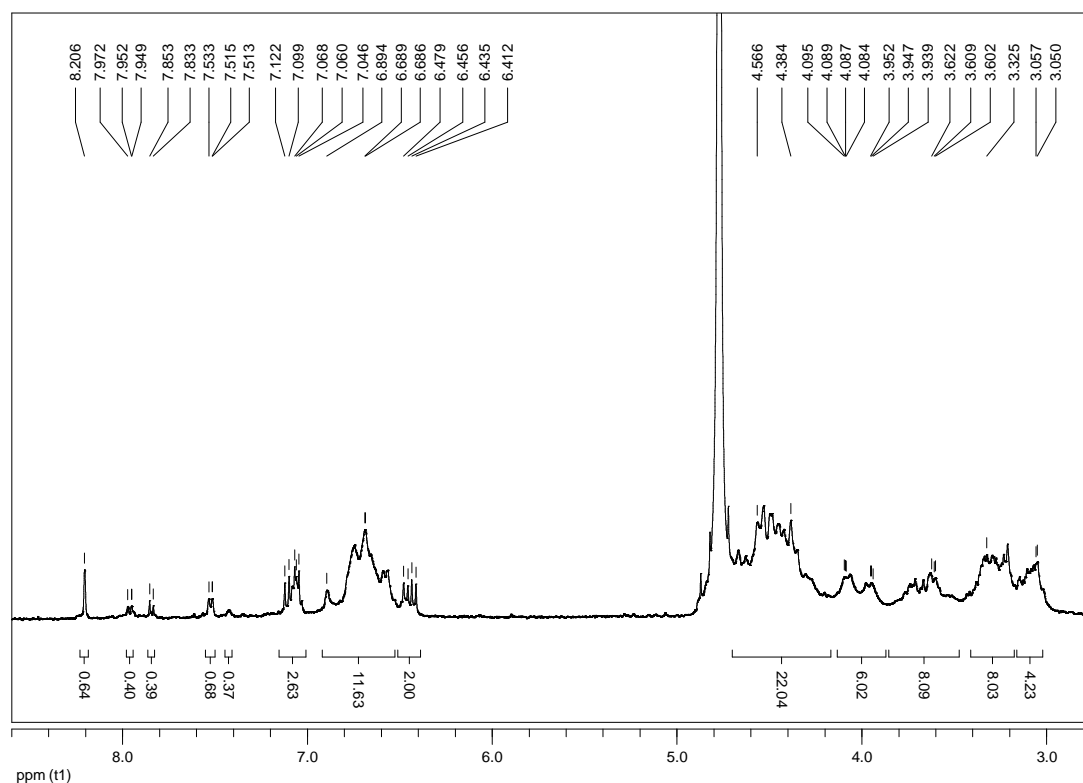
After HPLC purification, this compound was only obtained as a mixture of **137** and **148** (1:2).

The  $^1\text{H}$  NMR spectrum of **148** was deduced from the spectra of the mixture and of **137**.

$^1\text{H}$  NMR (700 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  8.21 (s, 1H), 7.52 (d, 1H,  $J = 7.6$  Hz), 7.12-7.05 (m, 3H), 6.89-6.50 (m, 12 H), 6.46 (d, 1H,  $J = 9.2$  Hz), 6.42 (d, 1H,  $J = 9.2$  Hz), 4.73-4.20 (m, 22H), 4.18-3.98 (m, 6H), 3.96-3.52 (m, 8H), 3.50-3.22 (m, 8H), 3.21-3.01 (m, 4H)

HRMS-ES $^-$  (m/z) calcd for  $\text{C}_{87}\text{H}_{75}\text{N}_2\text{O}_{29}\text{S}_4\text{As}_2$ , 1889.1770 found 1889.1757 ( $[\text{M}-\text{H}]^-$ ).

$^1\text{H}$  NMR of mixture of **148** and **137**





## HPLC chromatograms of **137** and **148**

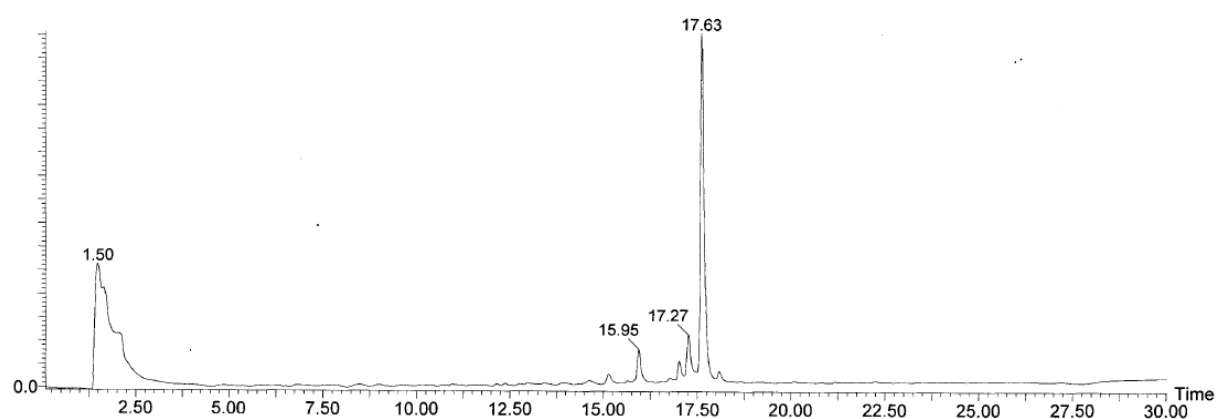
Purity checked on Luna PFP

Gradient: H<sub>2</sub>O/AcCN 95:5 to 20:80

Retention time for **137**: 17.62 min.

Peak at 15.95 corresponds to the product without one arsenic.

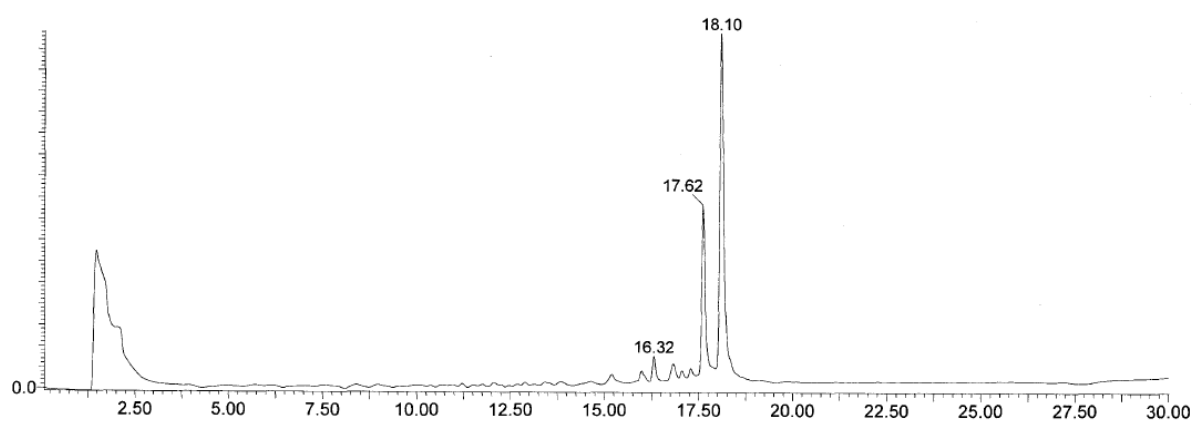
Peak at 17.27 is not identified.



Retention time for **148**: 18.10 min.

Peak at 16.32 corresponds to the product without one arsenic.

Peak at 17.62 corresponds to the isomer **137**



## Fluorescence experiments with compound **137**

These experiments were realized in collaboration with Nathalie Arhel at the Institut Pasteur.

### With virus

The following solutions of denaturing agents in H<sub>2</sub>O are prepared:

- $\beta$ -mercaptoethanol (0.1 M)
- TCEP (0.1 M)
- EDT (1 mM)

The fluorophores are dissolved in PBS to give solutions of:

- Biosensor **137** (50  $\mu$ M)
- FAsH (50  $\mu$ M) (as a control)

The virus is suspended in medium to give a solution of viral supernatant of 1100 ng/mL.

To a mixture of 10  $\mu$ L of each denaturing agent, 10  $\mu$ L of fluorophore solution is added. Then, 455  $\mu$ L viral supernatant (500 ng) and 505  $\mu$ L medium are added. The solution is mixed by inverting. Final concentrations in solution are:

- $\beta$ -mercaptoethanol (1 mM)
- TCEP (1 mM)
- EDT (1  $\mu$ M)
- Fluorophore solution (50 nM)
- Viral supernatant (500 ng/mL)

Labeling reaction is allowed to proceed for 2 h at room temperature in the dark on a rocker. Then, viruses are recovered and excess fluorophore is eliminated by ultracentrifugation at 40,000 rpm for 30 min at 4 °C in a Beckman TL55i rotor. After ultracentrifugation, supernatant is removed and residual drops are carefully removed from the sides of the tube using clean tissue paper. 150  $\mu$ L cold PBS are added onto the pellet (which would not be visible) and left for 30min at 4 °C to allow pellet to gently resuspend. The pellet is pipeted up and down to fully resuspend.

FAsH or CrAsH incorporation are assessed by spectrofluorescence using a microplate fluorometer with the following settings: fluorophore excitation 485 nm, emission 535 nm.

### With peptide

The peptide used has the following sequence: Ace-WEAAAREACCRECCARA-CONH<sub>2</sub>.  
It was purchased from ACTIVOTEC.

### **Tests with 50 $\mu$ M biosensor**

The following solutions of denaturing agents in H<sub>2</sub>O are prepared:

- $\beta$ -mercaptoethanol (10 mM)
- TCEP (10 mM)
- EDT (10 mM)

The fluorophore is dissolved in PBS to give a solution of:

- Biosensor **137** (500  $\mu$ M)

The peptide (1 mg) is dissolved in 1.03 mL H<sub>2</sub>O to give a solution of 500  $\mu$ M.

Each sample is composed of 10  $\mu$ L of each denaturing agent 10  $\mu$ L of fluorophore solution.

Then, peptide solution and PBS are added as follows:

Sample 1:	0 $\mu$ L peptide solution + 60 $\mu$ L PBS	(0 equivalent of peptide)
Sample 2:	2.5 $\mu$ L peptide solution + 57.5 $\mu$ L PBS	(0.25 equivalent of peptide)
Sample 3:	5 $\mu$ L peptide solution + 55 $\mu$ L PBS	(0.5 equivalent of peptide)
Sample 4:	10 $\mu$ L peptide solution + 50 $\mu$ L PBS	(1 equivalent of peptide)
Sample 5:	20 $\mu$ L peptide solution + 40 $\mu$ L PBS	(2 equivalents of peptide)

Final concentrations in solution are:

- $\beta$ -mercaptoethanol (1 mM)
- TCEP (1 mM)
- EDT (1 mM)
- Fluorophore solution (50  $\mu$ M)

Labeling reaction is monitored by spectrofluorescence using a microplate fluorometer with the following settings: fluorophore excitation 485 nm, emission 535 nm.

## Tests with 2.5 $\mu\text{M}$ biosensor

The following solutions of denaturing agents in  $\text{H}_2\text{O}$  are prepared:

- $\beta$ -mercaptoethanol (10 mM)
- TCEP (10 mM)
- EDT (10 mM)

The fluorophore is dissolved in PBS to give a solution of:

- Biosensor **137** (50  $\mu\text{M}$ )

The peptide (1 mg) is dissolved in 1.03 mL  $\text{H}_2\text{O}$  to give a solution of 500  $\mu\text{M}$ .

Each sample is composed of 10  $\mu\text{L}$  of each denaturing agent 5  $\mu\text{L}$  of fluorophore solution.

Then, peptide solution and PBS are added as follows:

Sample 1:	0 $\mu\text{L}$ peptide solution + 65 $\mu\text{L}$ PBS	(0 equivalent of peptide)
Sample 2:	0.5 $\mu\text{L}$ peptide solution + 64.5 $\mu\text{L}$ PBS	(1 equivalent of peptide)
Sample 3:	1 $\mu\text{L}$ peptide solution + 64 $\mu\text{L}$ PBS	(5 equivalents of peptide)
Sample 4:	5 $\mu\text{L}$ peptide solution + 60 $\mu\text{L}$ PBS	(10 equivalents of peptide)
Sample 5:	10 $\mu\text{L}$ peptide solution + 55 $\mu\text{L}$ PBS	(50 equivalents of peptide)

Final concentrations in solution are:

- $\beta$ -mercaptoethanol (1 mM)
- TCEP (1 mM)
- EDT (1 mM)
- Fluorophore solution (2.5  $\mu\text{M}$ )

Labeling reaction is monitored by spectrofluorescence using a microplate fluorometer with the following settings: fluorophore excitation 485 nm, emission 535 nm.

## Xenon experiments with compound **137**

### Preparation of the NMR samples

The following solutions of denaturing agents in H<sub>2</sub>O are prepared:

- $\beta$ -mercaptoethanol (10 mM)
- TCEP (10 mM)
- EDT (10 mM)

The fluorophore is dissolved in PBS to give a solution of :

- Biosensor **137** (500  $\mu$ M)

The peptide (1 mg) is dissolved in 1.03 mL H<sub>2</sub>O to give a solution of 500  $\mu$ M.

Each sample is composed of 70  $\mu$ L of each denaturing agent and 35  $\mu$ L of fluorophore solution. Then, peptide solution and PBS are added as follows:

Sample 1: 0  $\mu$ L peptide solution + 405  $\mu$ L PBS + 50  $\mu$ L D<sub>2</sub>O (0 equivalent of peptide)

Sample 2: 350  $\mu$ L peptide solution + 55  $\mu$ L PBS + 50  $\mu$ L D<sub>2</sub>O (10 equivalents of peptide)

Final concentrations in solution are:

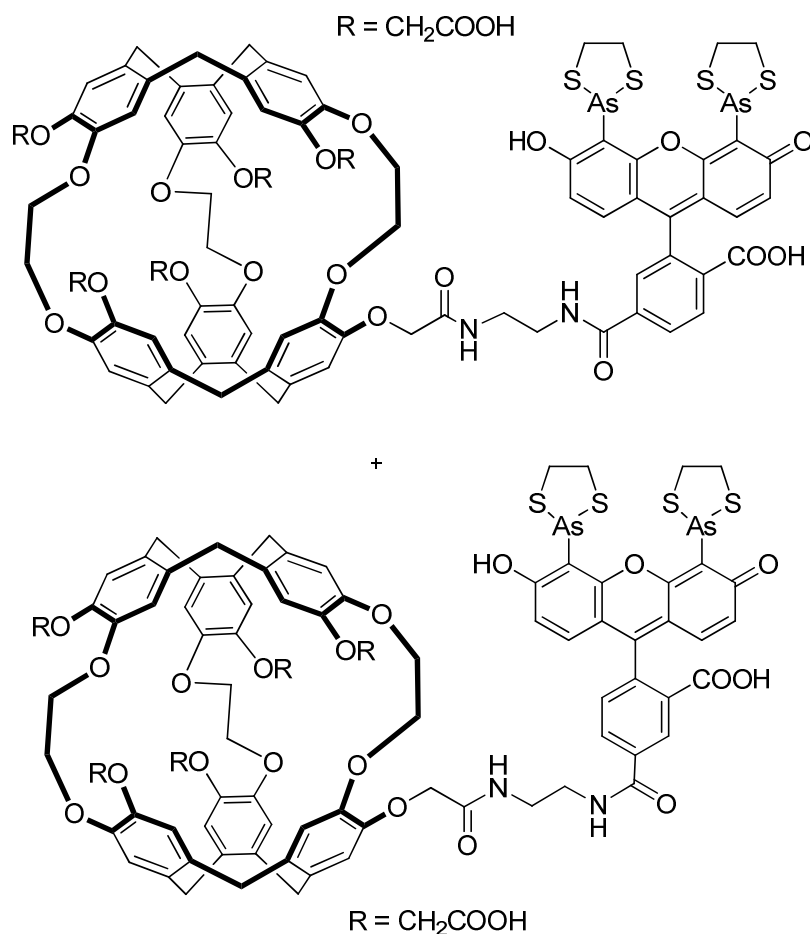
- $\beta$ -mercaptoethanol (1 mM)
- TCEP (1 mM)
- EDT (1 mM)
- Fluorophore solution (25  $\mu$ M)

### Recording of <sup>129</sup>Xe NMR spectra

Xenon spectra were recorded by Patrick Berthault and his team at the laboratoire LSDRM of Saclay with the same apparatus in the same conditions as stated for biosensor **105**.

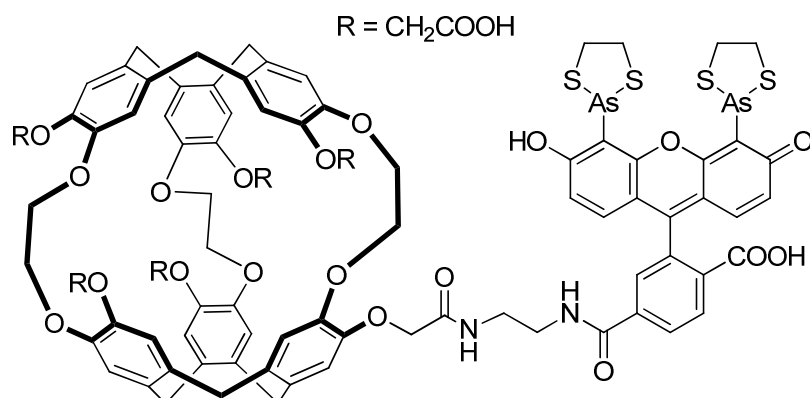
The <sup>129</sup>Xe spectra and the images shown were recorded at 11.7 T and 293 K with HNX-TBI and dual 129Xe-1H 5 mm Bruker probe heads for the former and a micro-5 Bruker probe head for the latter. The signals are referenced with respect to xenon in water (196 ppm).

Compound MM-137 and MM-148



N-hydroxysuccinimide (1.0 mg, 8.6  $\mu\text{mol}$ ) and N'-ethyl-Ndimethylaminopropylcarbodiimide (1.8 mg, 9.4  $\mu\text{mol}$ ) were added under argon atmosphere to a stirred solution of PP-35 (10 mg, 8.6  $\mu\text{mol}$ ) in DMSO (0.1 mL). The mixture was stirred for 5 hours at room temperature. Then a solution of crude **146** and **147** (4.5 mg) dissolved in DMSO (0.1 mL) and triethylamine were added. The solution was then stirred for an additional 16 hours at room temperature. The excess of triethylamine was removed under reduced pressure. The solution was then directly injected for purification on preparative HPLC chromatography (Luna PFP column. Size: 150x21, gradient: 95/5 to 30/70  $\text{H}_2\text{O}/\text{AcCN}$  + 0.1 %  $\text{HCOOH}$ ) to give MM-137 (2.4 mg, 15 %) and MM-148 (1.4 mg, 9 %) as orange solids.

Compound MM-137

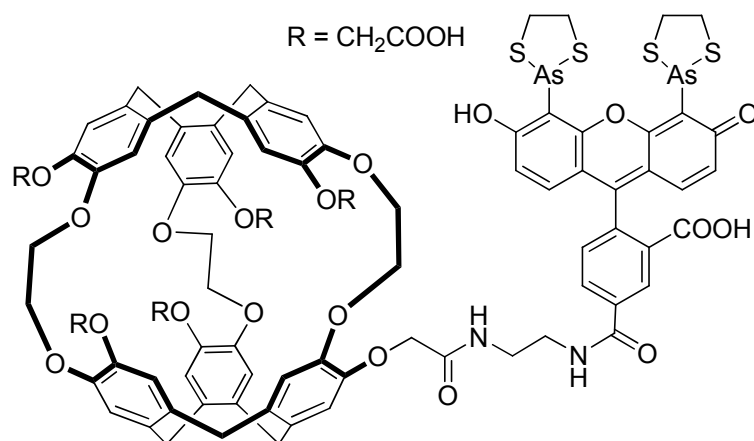


Orange solid

$^1\text{H}$  NMR (700 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  7.91 (d, 1H,  $J = 8.0$  Hz), 7.78 (d, 1H,  $J = 8.0$  Hz), 7.37 (s, 1H), 6.98 (d, 1H,  $J = 9.2$  Hz), 6.94 (d, 1H,  $J = 9.2$  Hz), 6.76-6.48 (m, 12H), 6.46 (d, 2H,  $J = 9.2$  Hz), 4.60-4.18 (m, 24H), 4.16-3.89 (m, 4H), 3.84-3.46 (m, 8H), 3.37-3.22 (m, 6H), 3.21-3.03 (m, 6H)

MS (ESI-TOF)  $m/z$ : 1892.3 (100%,  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ).

Compound MM-148



Orange solid

After HPLC purification, this compound was obtained as a mixture of MM-137 and MM-148 (1:8).

$^1\text{H}$  NMR (700 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  8.21 (s, 1H), 7.52 (d, 1H,  $J = 7.6$  Hz), 7.12-7.05 (m, 3H), 6.89-6.50 (m, 12 H), 6.46 (d, 1H,  $J = 9.2$  Hz), 6.42 (d, 1H,  $J = 9.2$  Hz), 4.73-4.20 (m, 22H), 4.18-3.98 (m, 6H), 3.96-3.52 (m, 8H), 3.50-3.22 (m, 8H), 3.21-3.01 (m, 4H)

MS (ESI-TOF)  $m/z$ : 1892.5 (100%,  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ).



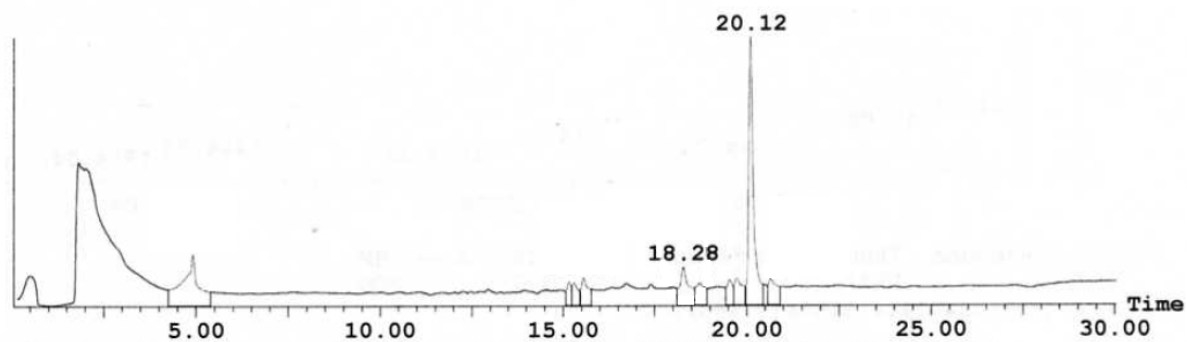
## HPLC chromatograms of MM-**137** and MM-**148**

Purity checked on Luna PFP

Gradient: H<sub>2</sub>O/AcCN 95:5 to 30:70

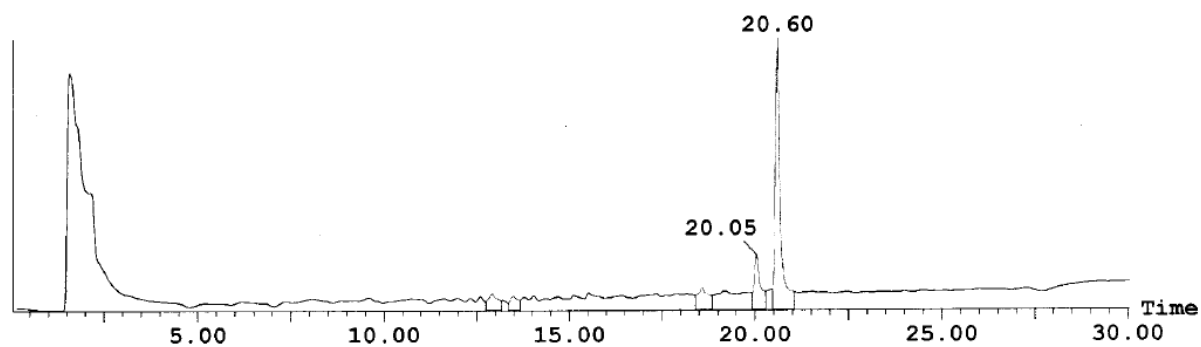
Retention time for MM-**137**: 20.12 min.

Peak at 18.28 corresponds to the product without one arsenic.



Retention time for MM-**148**: 20.60 min.

Peak at 20.05 corresponds to the isomer **137**



## Fluorescence experiments with compound MM-137

### With Peptide : tests with 25 $\mu$ M biosensor

The following solutions of denaturing agents in H<sub>2</sub>O are prepared:

- $\beta$ -mercaptoethanol (10 mM)
- TCEP (10 mM)
- EDT (10 mM)

The fluorophore is dissolved in PBS to give a solution of:

- Biosensor MM-137 (500  $\mu$ M)

The peptide (1 mg) is dissolved in 1.03 mL H<sub>2</sub>O to give a solution of 500  $\mu$ M.

Each sample is composed of 10  $\mu$ L of each denaturing agent 5  $\mu$ L of fluorophore solution.

Then, peptide solution and PBS are added as follows:

Sample 1: 0  $\mu$ L peptide solution + 65  $\mu$ L PBS (0 equivalent of peptide)

Sample 2: 50  $\mu$ L peptide solution + 15  $\mu$ L PBS (10 equivalents of peptide)

Final concentrations in solution are:

- $\beta$ -mercaptoethanol (1 mM)
- TCEP (1 mM)
- EDT (1 mM)
- Fluorophore solution (25  $\mu$ M)

Labeling reaction is monitored by spectrofluorescence using a microplate fluorometer with the following settings: fluorophore excitation 485 nm, emission 535 nm.

## Xenon experiments with compound MM-137

### Preparation of the NMR samples

The following solutions of denaturing agents in H<sub>2</sub>O are prepared:

- $\beta$ -mercaptoethanol (10 mM)
- TCEP (10 mM)
- EDT (10 mM)

The fluorophore is dissolved in PBS to give a solution of :

- Biosensor MM-137 (500  $\mu$ M)

The peptide (1 mg) is dissolved in 1.03 mL H<sub>2</sub>O to give a solution of 500  $\mu$ M.

Each sample is composed of 70  $\mu$ L of each denaturing agent and 35  $\mu$ L of fluorophore solution. Then, peptide solution and PBS are added as follows:

Sample 1: 0  $\mu$ L peptide solution + 405  $\mu$ L PBS + 50  $\mu$ L D<sub>2</sub>O (0 equivalent of peptide)

Sample 2: 350  $\mu$ L peptide solution + 55  $\mu$ L PBS + 50  $\mu$ L D<sub>2</sub>O (10 equivalents of peptide)

pH was adjusted to 7 by adding K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

Final concentrations in solution are:

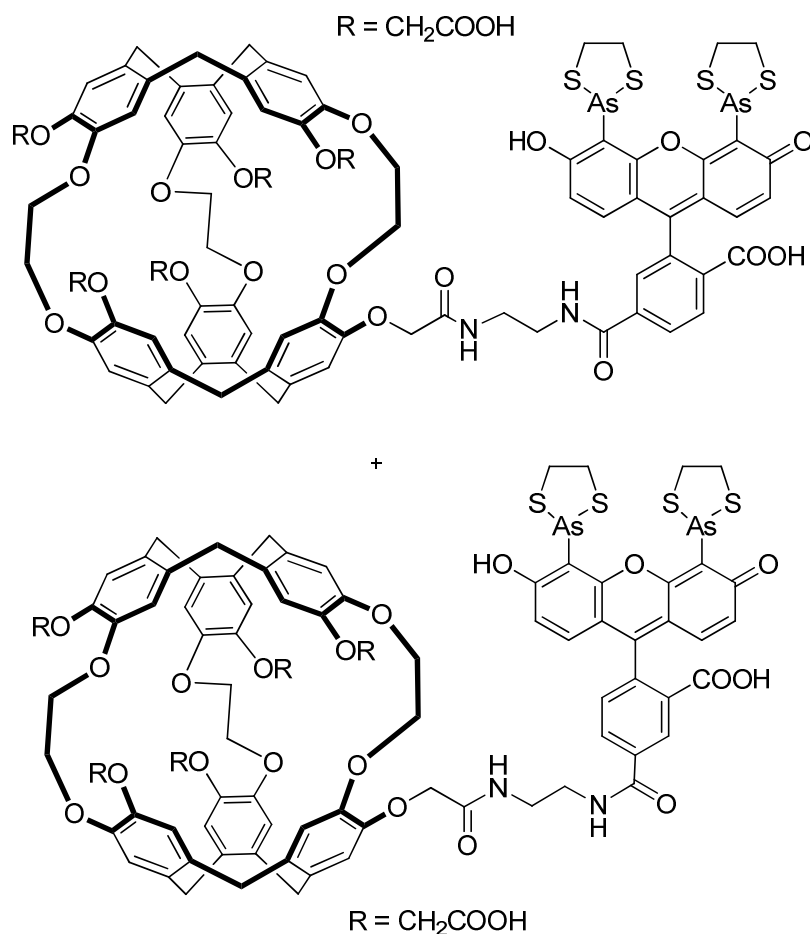
- $\beta$ -mercaptoethanol (1 mM)
- TCEP (1 mM)
- EDT (1 mM)
- Fluorophore solution (25  $\mu$ M)

### Recording of <sup>129</sup>Xe NMR spectra

Xenon spectra were recorded by Patrick Berthault and his team at the laboratoire LSDRM of Saclay with the same apparatus in the same conditions as stated for biosensor **105**.

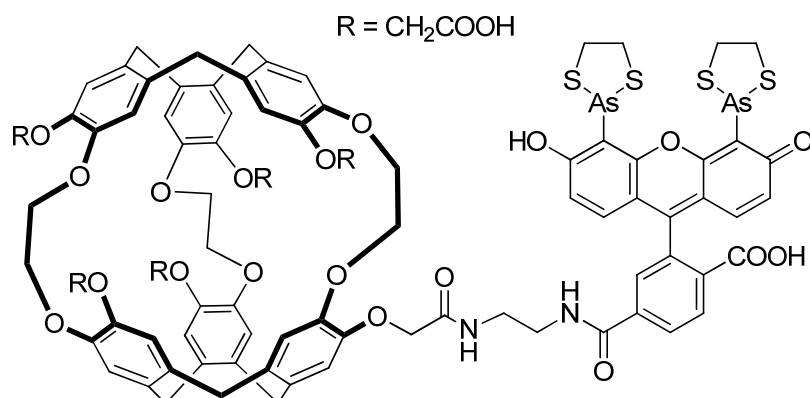
The <sup>129</sup>Xe spectra and the images shown were recorded at 11.7 T and 293 K with HNX-TBI and dual 129Xe-1H 5 mm Bruker probe heads for the former and a micro-5 Bruker probe head for the latter. The signals are referenced with respect to xenon in water (196 ppm).

Compound PP-137 and PP-148



N-hydroxysuccinimide (1.0 mg, 8.6  $\mu\text{mol}$ ) and N'-ethyl-Ndimethylaminopropylcarbodiimide (1.8 mg, 9.4  $\mu\text{mol}$ ) were added under argon atmosphere to a stirred solution of PP-35 (10 mg, 8.6  $\mu\text{mol}$ ) in DMSO (0.1 mL). The mixture was stirred for 5 hours at room temperature. Then a solution of crude **146** and **147** (4.5 mg) dissolved in DMSO (0.1 mL) and triethylamine were added. The solution was then stirred for an additional 16 hours at room temperature. The excess of triethylamine was removed under reduced pressure. The solution was then directly injected for purification on preparative HPLC chromatography (Luna PFP column. Size: 150x21, gradient: 95/5 to 30/70  $\text{H}_2\text{O}/\text{AcCN}$  + 0.1 %  $\text{HCOOH}$ ) to give PP-137 (17 %) and PP-148 (10 %) as orange solids.

Compound PP-137

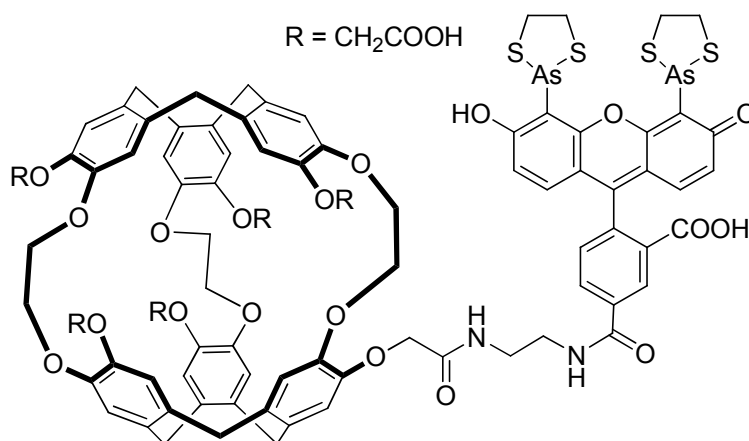


Orange solid

$^1\text{H}$  NMR (700 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  7.91 (d, 1H,  $J = 8.0$  Hz), 7.78 (d, 1H,  $J = 8.0$  Hz), 7.37 (s, 1H), 6.98 (d, 1H,  $J = 9.2$  Hz), 6.94 (d, 1H,  $J = 9.2$  Hz), 6.76-6.48 (m, 12H), 6.46 (d, 2H,  $J = 9.2$  Hz), 4.60-4.18 (m, 24H), 4.16-3.89 (m, 4H), 3.84-3.46 (m, 8H), 3.37-3.22 (m, 6H), 3.21-3.03 (m, 6H)

MS (ESI-TOF)  $m/z$ : 1892.3 (100%,  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ).

**Compound PP-148**



Orange solid

After HPLC purification, this compound was obtained as a mixture of PP-**137** and PP-**148** (1:8).

$^1\text{H}$  NMR (700 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  8.21 (s, 1H), 7.52 (d, 1H,  $J = 7.6$  Hz), 7.12-7.05 (m, 3H), 6.89-6.50 (m, 12 H), 6.46 (d, 1H,  $J = 9.2$  Hz), 6.42 (d, 1H,  $J = 9.2$  Hz), 4.73-4.20 (m, 22H), 4.18-3.98 (m, 6H), 3.96-3.52 (m, 8H), 3.50-3.22 (m, 8H), 3.21-3.01 (m, 4H)

MS (ESI-TOF)  $m/z$ : 1892.5 (100%,  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ).

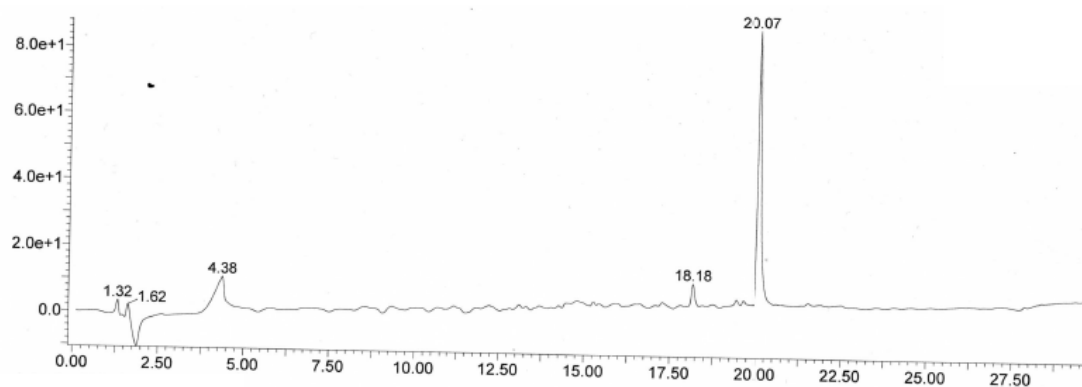
## HPLC chromatograms of PP-**137** and PP-**148**

Purity checked on Luna PFP

Gradient: H<sub>2</sub>O/AcCN 95:5 to 30:70

Retention time for PP-**137**: 20.07 min.

Peak at 18.18 corresponds to the product without one arsenic.

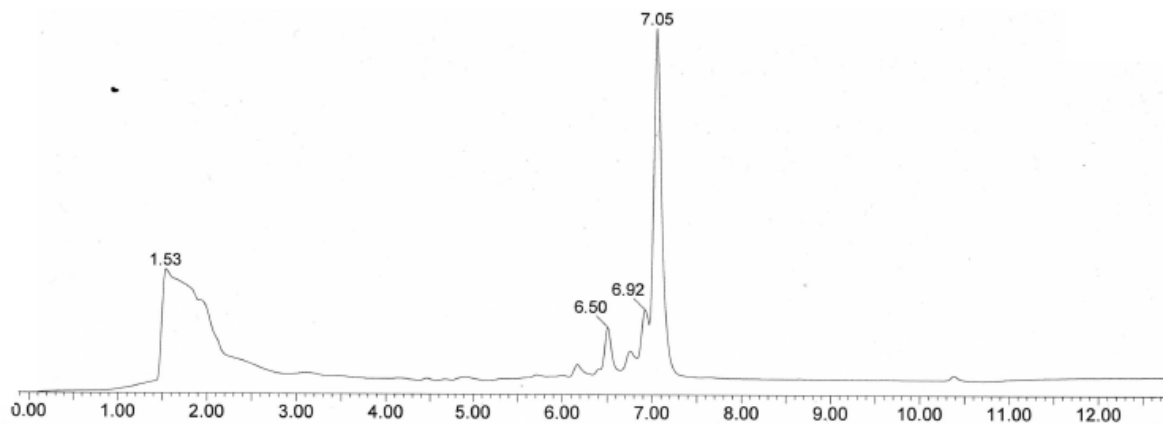


Gradient: H<sub>2</sub>O/AcCN 95:5 to 0:100

Retention time for PP-**148**: 7.05 min.

Peak at 6.92 corresponds to the isomer **137**

Peak at 6.50 corresponds to the product without one arsenic.



## Fluorescence experiments with compound PP-**137**

### With Peptide : tests with 25 $\mu$ M biosensor

The following solutions of denaturing agents in H<sub>2</sub>O are prepared:

- $\beta$ -mercaptoethanol (10 mM)
- TCEP (10 mM)
- EDT (10 mM)

The fluorophore is dissolved in PBS to give a solution of:

- Biosensor PP-**137** (500  $\mu$ M)

The peptide (1 mg) is dissolved in 1.03 mL H<sub>2</sub>O to give a solution of 500  $\mu$ M.

Each sample is composed of 10  $\mu$ L of each denaturing agent 5  $\mu$ L of fluorophore solution.

Then, peptide solution and PBS are added as follows:

Sample 1: 0  $\mu$ L peptide solution + 65  $\mu$ L PBS (0 equivalent of peptide)

Sample 2: 50  $\mu$ L peptide solution + 15  $\mu$ L PBS (10 equivalents of peptide)

Final concentrations in solution are:

- $\beta$ -mercaptoethanol (1 mM)
- TCEP (1 mM)
- EDT (1 mM)
- Fluorophore solution (25  $\mu$ M)

Labeling reaction is monitored by spectrofluorescence using a microplate fluorometer with the following settings: fluorophore excitation 485 nm, emission 535 nm.



## Xenon experiments with compound PP-**137**

### Preparation of the NMR samples

The following solutions of denaturing agents in H<sub>2</sub>O are prepared:

- $\beta$ -mercaptoethanol (10 mM)
- TCEP (10 mM)
- EDT (10 mM)

The fluorophore is dissolved in PBS to give a solution of :

- Biosensor PP-**137** (500  $\mu$ M)

The peptide (1 mg) is dissolved in 1.03 mL H<sub>2</sub>O to give a solution of 500  $\mu$ M.

Each sample is composed of 70  $\mu$ L of each denaturing agent and 35  $\mu$ L of fluorophore solution. Then, peptide solution and PBS are added as follows:

Sample 1: 0  $\mu$ L peptide solution + 405  $\mu$ L PBS + 50  $\mu$ L D<sub>2</sub>O (0 equivalent of peptide)

Sample 2: 350  $\mu$ L peptide solution + 55  $\mu$ L PBS + 50  $\mu$ L D<sub>2</sub>O (10 equivalents of peptide)

pH was adjusted to 7 by adding K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

Final concentrations in solution are:

- $\beta$ -mercaptoethanol (1 mM)
- TCEP (1 mM)
- EDT (1 mM)
- Fluorophore solution (25  $\mu$ M)

### Recording of <sup>129</sup>Xe NMR spectra

Xenon spectra were recorded by Patrick Berthault and his team at the laboratoire LSDRM of Saclay with the same apparatus in the same conditions as stated for biosensor **105**.

The <sup>129</sup>Xe spectra and the images shown were recorded at 11.7 T and 293 K with HNX-TBI and dual 129Xe-1H 5 mm Bruker probe heads for the former and a micro-5 Bruker probe head for the latter. The signals are referenced with respect to xenon in water (196 ppm).



## **RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES**



## Références bibliographiques

- <sup>1</sup> J. Gabard, A. Collet, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1981**, 1137
- <sup>2</sup> M. M. Spence, S. M. Rubin, I. E. Dimitrov, E. J. Ruiz, D. E. Wemmer, A. Pines, S. Q. Yaoi, F. Tiani, P. G. Schultz, *PNAS*, **2001**, 98, 10654
- <sup>3</sup> S. Pirot, *Neuropsychiatrie : Tendances et Débats* **2008**, 33, 37
- <sup>4</sup> Journal du CNRS n°260-261, septembre-octobre **2011**
- <sup>5</sup> P.C. Lauterbur, *Nature New. Biol.*, **1973**, 242, 190
- <sup>6</sup> L. Emsley, Cours M1 RMN Structurale
- <sup>7</sup> N. Colloc'h, J. Sopkova-de Oliveira Santos, P. Retailleau, D. Vivarès, F. Bonneté, B. Langlois d'Estainto, B. Gallois, A. Brisson, J. J. Risso, M. Lemaire, T. Prangé, J.H. Abraini, *Biophys. J.*, **2007**, 92, 217
- <sup>8</sup> K. Kawakami, *Ann. Nucl. Med.*, **1997**, 11, 67
- <sup>9</sup> M. S. Albert, G. D. Cates, B. Driehuys, W. Happer, B. Saam, C. S. Springer, Jr, A. Wishnia, *Nature*, **1994**, 370, 199
- <sup>10</sup> J. P. Mugler III, B. Driehuys, J. R. Brookeman, G. D. Cates, S. S. Berr, R. G. Bryant, T. M. Daniel, E. E. del Lange, J. H. Downs III, C. J. Erickson, W. Happer, D. P. Hinton, N. F. Kassel, T. Maier, C. D. Phillips, B. T. Saam, K. L. Sauer, M. E. Wagshul, *Magn. Reson. Med.*, **1997**, 37, 809
- <sup>11</sup> B. M. Goodson, *Journal of Magnetic Resonance*, **2002**, 155, 157
- <sup>12</sup> T. Pietrass, H. C. Gaede, *Adv. Mat.*, **1995**, 7, 826
- <sup>13</sup> C. Boutin, H. Desvaux, M. Carrière, F. Leteur, N. Jamin, Y. Boulard, P. Berthault, *NMR Biomed.*, **2011**, 24, 1264
- <sup>14</sup> A. J. Kastler, *Phys. Radium*, **1950**, 11, 225
- <sup>15</sup> M. A. Bouchiat, T. R. Carver, C. M. Varnum, *Phys. Rev. Lett.*, **1960**, 5, 373
- <sup>16</sup> B. M. Goodson, *Journal of Magnetic Resonance*, **2002**, 155, 157
- <sup>17</sup> P. Berthault, G. Hubert, H. Desvaux, *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, **2009**, 55, 35
- <sup>18</sup> S.I. Han, S. Garcia, T.J. Lowery, E.J. Ruiz, J.A. Seeley, L. Chavez, D.S. King, D.E. Wemmer, A. Pines, *Anal. Chem.* **2005**, 77, 4008
- <sup>19</sup> D. Baumer, E. Brunner, P. Blümli, P.P. Zänker, H.W. Spiess, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, 45, 7282
- <sup>20</sup> S.D. Swanson, M.S. Rosen, B.W. Agranoff, K.P. Coulter, R.C. Welsh, T.E. Chupp, *Magn. Reson. Med.* **1997**, 38, 695.
- <sup>21</sup> G. Duhamel, P. Choquet, E. Grillon, L. Lamalle, J.-L. Leviel, A. Ziegler, A. Constantinesco, *Magn. Reson. Med.*, **2001**, 46, 208
- <sup>22</sup> B.M. Goodson, Y.Q. Song, R.E. Taylor, V.D. Schepkin, K.M. Brennan, G.C. Chingas, T.F. Budinger, G. Navon, A. Pines, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1997**, 94, 14725
- <sup>23</sup> J.G. Riess, *Chem. Rev.*, **2001**, 101, 2797
- <sup>24</sup> A.K. Venkatesh, L. Zhao, D. Balamore, F.A. Jolesz, M.S. Albert, *NMR Biomed.*, **2000**, 13, 245
- <sup>25</sup> J. Wolber, I.J. Rowland, M.O. Leach, A. Bifone, *Magn. Reson. Med.* **1999**, 41, 442
- <sup>26</sup> G. Duhamel, P. Choquet, E. Grillon, J.-L. Leviel, A. Ziegler, A. Constantinesco, *C.R. Acad. Sci. Paris*, **2001**, 4, 789
- <sup>27</sup> S. Mecozzi, J. Rebek Jr., *Chem. Eur. J.*, **1998**, 4, 1016
- <sup>28</sup> J. Černý, P. Hobza, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2007**, 9, 5291
- <sup>29</sup> F. London, *Z. Phys.*, **1930**, 60, 491.
- <sup>30</sup> D.M. Rudkevich, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2004**, 43, 558
- <sup>31</sup> K. Bartik, M. Luhmer, S.J. Heyes, R. Ottinger, J. Reisse, *J. Magn. Reson. B*, **1995**, 109, 164
- <sup>32</sup> J. Fukutomi, Y. Adachi, A. Kaneko, A. Kimura, H. Fujiwara, *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.*, **2007**, 58, 115
- <sup>33</sup> D. J. Cram, M. E. Tanner, C. B. Knobler, *J. Am. Chem. Soc.*, **1991**, 113, 7717
- <sup>34</sup> Y. Miyahara, K. Abe, T. Inazu, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2002**, 41, 3020
- <sup>35</sup> M. El Haouaj, M. Luhmer, Y. Ho Ko, K. Kim, K. Bartik, *J. Chem. Soc., Perkin Trans.*, **2001**, 2, 804
- <sup>36</sup> B. S. Kim, Y. H. Ko, Y. Kim, H. J. Lee, N. Selvapalam, H.C. Lee, K. Kim, *Chem Commun*, **2008**, 2756
- <sup>37</sup> R. M. Fairchild, A. I. Joseph, K. Travis Holman, H. A. Fogarty, T. Brotin, J.-P. Dutasta, C. Boutin, G. Huber, P. Berthault, *J. Am. Chem. Soc.*, **2010**, 132, 15505
- <sup>38</sup> L. Schröder, T. J. Lowery, C. Hilty, D. E. Wemmer, A. Pines, *Science*, **2006**, 314, 446
- <sup>39</sup> A. D. Sherry, M. Woods, *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, **2008**, 10, 391
- <sup>40</sup> L. Schröder, *Physica Medica*, **2011**, doi:10.1016/j.ejmp.2011.11.001
- <sup>41</sup> M. Kunth, J. Döpfert, C. Witte, F. Rossella, L. Schröder, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2012**, doi:10.1002/anie.201202481
- <sup>42</sup> J. L. Mynar, T. J. Lowery, D. E. Wemmer, A. Pines, J. M. J. Fréchet, *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, 128, 6334

- <sup>43</sup> T. Meldrum, K. L. Seim, V. S. Bajaj, K. K. Palaniappan, W. Wu, M. B. Francis, D. E. Wemmer, A. Pines, *J. Am. Chem. Soc.*, **2010**, *132*, 5936
- <sup>44</sup> J. M. Hooker, A. Datta, M. Botta, K. N. Raymond, M. B. Francis, *Nano Lett.*, **2007**, *7*, 2207
- <sup>45</sup> A. Datta, J. M. Hooker, M. Botta, M. B. Francis, S. Aime, K. N. Raymond, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 2546
- <sup>46</sup> T. K. Stevens, K. K. Palaniappan, R. M. Ramirez, M. B. Francis, D. E. Wemmer, A. Pines, *Magn. Reson. Med.*, **2012**, doi:10.1002/mrm.24371
- <sup>47</sup> P. Berthault, A. Bogaert-Buchmann, H. Desvaux, G. Huber, Y. Boulard, *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, *130*, 16456
- <sup>48</sup> G. M. Robinson, *J. Chem. Soc.*, **1915**, *102*, 266
- <sup>49</sup> A. S. Lindsey, *J. Chem. Soc.*, **1965**, 1685
- <sup>50</sup> H. Erdtman, F. Haglid, R. Ryhage, *Acta. Chem. Scand.*, **1964**, *18*, 1249
- <sup>51</sup> A. Goldup, A. B. Morrison, G. W. Smith, *J. Chem. Soc.*, **1965**, 3864
- <sup>52</sup> A. Collet, *Tetrahedron*, **1987**, *43*, 5725
- <sup>53</sup> J. D. White, B.D. Gesner, *Tetrahedron*, **1974**, *30*, 2273
- <sup>54</sup> A. Collet, J. Jacques, *Tetrahedron Lett.*, **1978**, 1265
- <sup>55</sup> A. Collet, J. Gabard, J. Jacques, M. Cesario, J. Guilhem, C. Pascard, *J. Chem. Soc., Perkin Trans.*, **1981**, *1*, 1630
- <sup>56</sup> J. Canceill, A. Collet, J. Gabard, G. Gottarelli, G. P. Spada, *J. Am. Chem. Soc.*, **1985**, *107*, 1299
- <sup>57</sup> J. Canceill, A. Collet, G. Gottarelli, *J. Am. Chem. Soc.*, **1984**, *106*, 5997
- <sup>58</sup> J. Canceill and A. Collet, *Nouv. J. Chim.*, **1986**, *10*, 17
- <sup>59</sup> T. Brotin, J.-P. Dutasta, *Chem. Rev.*, **2009**, *109*, 88
- <sup>60</sup> K. T. Holman, *Encyclopedia of Supramolecular Chemistry*, **2004**
- <sup>61</sup> A. Collet, J.-P. Dutasta, B. Lozach, J. Canceill, *Topics in Current Chemistry*, **1993**, *165*
- <sup>62</sup> S. T. Mough, J. C. Goeltz, K. T. Holman, *Angew. Chem.*, **2004**, *43*, 5631
- <sup>63</sup> D. Cram, M. Tanner, S. Keipert, C. Knobler, *J. Am. Chem. Soc.*, **1991**, *113*, 8909
- <sup>64</sup> H. Fogarty, P. Berthault, T. Brotin, G. Huber, H. Desvaux, J.-P. Dutasta, *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, *129*, 10332
- <sup>65</sup> M. A. Little, J. Donkin, J. Fisher, M. A. Halcrow, J. Loder, M. J. Hardie, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2011**, *50*, 764
- <sup>66</sup> V. Roy, T. Brotin, J.-P. Dutasta, M.-H. Charles, T. Delair, F. Mallet, G. Huber, H. Desvaux, Y. Boulard, P. Berthault, *ChemPhysChem*, **2007**, *8*, 2082
- <sup>67</sup> Q. Wei, G. K. Seward, P. A. Hill, B. Patton, I. E. Dimitrov, N. N. Kuzma, I. J. Dmochowski, *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, *128*, 13274
- <sup>68</sup> A. Schlundt, W. Kilian, M. Beyermann, J. Sticht, S. Gunther, S. Hopner, K. Falk, O. Roetzschke, L. Mitschang, C. Freund, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2009**, *48*, 4142
- <sup>69</sup> T. Brotin, J.-P. Dutasta, *Eur. J. Org. Chem.*, **2003**, 973
- <sup>70</sup> T. Brotin, R. Darbe, M. Darzac, J.-P. Dutasta, *Chem. Eur. J.*, **2003**, *9*, 5784
- <sup>71</sup> P. A. Hill, Q. Wei, R. G. Eckenhoff, I. J. Dmochowski, *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, *129*, 9262
- <sup>72</sup> P. A. Hill, Q. Wei, T. Troxler, I. J. Dmochowski, *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, *131*, 3069
- <sup>73</sup> O. Taratula, P. A. Hill, Y. Bai, N. S. Khan, I. J. Dmochowski, *Org. Lett.*, **2011**, *13*, 1414
- <sup>74</sup> O. Taratula, M. P. Kim, Y. Bai, J. P. Philbin, B. A. Riggle, D. N. Haase, I. J. Dmochowski, *Org. Lett.*, **2012**, doi:10.1021/ol300943w
- <sup>75</sup> J. Canceill, L. Lacombe, A. Collet, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1987**, 219
- <sup>76</sup> P. Berthault, H. Desvaux, T. Wendlinger, M. Gyejacquot, A. Stopin, T. Brotin, J.-P. Dutasta, Y. Boulard, *Chem. Eur. J.*, **2010**, *16*, 12941
- <sup>77</sup> T. Brotin, R. Montserret, A. bouchet, D. Cavagnat, M. Linares, T. Buffeteau, *J. Org. Chem.*, **2012**, *77*, 1198
- <sup>78</sup> T. Brotin, V. Roy, J.-P. Dutasta, *J. Org. Chem.*, **2005**, *70*, 6187
- <sup>79</sup> T. Traoré, L. Delacour, S. Garcia-Argote, P. Berthault, J.-C. Cintrat, B. Rousseau, *Org. Lett.*, **2010**, *12*, 960
- <sup>80</sup> T. Traoré, L. Delacour, N. Kotera, G. Merer, C. Dupont, B. Rousseau, *Org. Process Res. Dev.*, **2011**, *15*, 435
- <sup>81</sup> T. Traoré, Thèse de doctorat en chimie organique de l'Université Paris Sud
- <sup>82</sup> T. Traoré, G. Clavé, L. Delacour, N. Kotera, P.-Y. Renard, A. Romieu, P. Berthault, C. Boutin, N. Tassali, B. Rousseau, *Chem. Commun.*, **2011**, *47*, 9702
- <sup>83</sup> L. Delacour, Thèse de doctorat en chimie organique de l'Université Paris Sud
- <sup>84</sup> J. Canceill, L. Lacombe, A. Collet, *J. Am. Chem. Soc.*, **1985**, *107*, 6993
- <sup>85</sup> J. Canceill, M. Cesario, A. Collet, J. Guilhem, L. Lacombe, B. Lozach, C. Pascard, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1989**, *28*, 1246
- <sup>86</sup> J. Canceill, L. Lacombe, A. Collet, *J. Am. Chem. Soc.*, **1986**, *108*, 4230
- <sup>87</sup> J. Canceill, M. Cesario, A. Collet, J. Guilhem, C. Pascard, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1985**, 361
- <sup>88</sup> J. Canceill, M. Cesario, A. Collet, J. Guilhem, C. Riche, C. Pascard, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1986**, 339
- <sup>89</sup> L. Garel, B. Lozach, J.-P. Dutasta, A. Collet, *J. Am. Chem. Soc.*, **1993**, *115*, 11652
- <sup>90</sup> L. Garel, J.-P. Dutasta, A. Collet, *Angew. Chem.*, **1993**, *32*, 1169
- <sup>91</sup> K. Bartik, M. Luhmer, J.-P. Dutasta, A. Collet, J. Reisse, *J. Am. Chem. Soc.*, **1998**, *120*, 784

- <sup>92</sup> A. Bouchet, T. Brotin, M. Linares, H. Agren, D. Cavagnat, T. Buffeteau, *J. Org. Chem.*, **2011**, 76, 4178
- <sup>93</sup> A. Bouchet, T. Brotin, M. Linares, D. Cavagnat, T. Buffeteau, *J. Org. Chem.*, **2011**, 76, 7816
- <sup>94</sup> D. R. Jacobson, N. S. Khan, R. Collé, R. Fitzgerald, L. Laureano-Pérez, Y. Baia, I. J. Dmochowski, *PNAS*, **2011**, 108, 10969
- <sup>95</sup> C. Tao, X. Li, J. Yang, Y. Shi, *Sensors and Actuators B*, **2011**, 156, 553
- <sup>96</sup> O. Taratula, P. A. Hill, N. S. Khan, P. J. Carroll, I. J. Dmochowski, *Nat. Commun.*, **2010**, 1, 148
- <sup>97</sup> A. Nicholls, B. Sharp, B. Honig, *Proteins*, **1991**, 11, 281
- <sup>98</sup> T. Brotin, J.-P. Dutasta, *Eur. J. Org. Chem.*, **2003**, 973
- <sup>99</sup> G. Huber, L. Beguin, H. Desvaux, T. Brotin, H. Fogarty, J.-P. Dutasta, P. Berthault, *J. Phys. Chem. A*, **2008**, 112, 11363
- <sup>100</sup> H. Desvaux, G. Huber, T. Brotin, J.-P. Dutasta, P. Berthault, *Chem. Phys. Chem.*, **2003**, 4, 384
- <sup>101</sup> A. Bagno, G. Saielli, *Chem. Eur. J.*, **2012**, 18, 7341
- <sup>102</sup> T. Brotin, A. Lesage, L. Emsley, A. Collet, *J. Am. Chem. Soc.*, **2000**, 122, 1171
- <sup>103</sup> M. M. Spence, E. J. Ruiz, S. M. Rubin, T. J. Lowery, N. Winssinger, P. G. Schultz, D. E. Wemmer, A. Pines, *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, 126, 15287
- <sup>104</sup> C. Hilty, T. J. Lowery, D. E. Wemmer, A. Pines, *Angew. Chem.*, **2006**, 118, 76
- <sup>105</sup> T. J. Lowery, S. Garcia, L. Chavez, E. J. Ruiz, T. Wu, T. Brotin, J.-P. Dutasta, D. S. King, P. G. Schultz, A. Pines, D. E. Wemmer, *ChemBioChem*, **2006**, 7, 65
- <sup>106</sup> F. Schilling, L. Schröder, K. K. Palaniappan, S. Zapf, D. E. Wemmer, A. Pines, *ChemPhysChem* **2010**, 11, 3529
- <sup>107</sup> C. Boutin, A. Stopin, F. Lenda, T. Brotin, J.-P. Dutasta, N. Jamin, A. Sanson, Y. Boulard, F. Leteurtre, G. Huber, A. Bogaert-Buchmann, N. Tassali, H. Desvaux, M. Carrière, P. Berthault, *Bioorg. Med. Chem.*, **2011**, 19, 4135
- <sup>108</sup> J. M. Chambers, P. A. Hill, J. A. Aaron, Z. Han, D. W. Christianson, N. N. Kuzma, I. J. Dmochowski, *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, 131, 563
- <sup>109</sup> J. A. Aaron, J. M. Chambers, K. M. Jude, L. Di Costanzo, I. J. Dmochowski, D. W. Christianson *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, 130, 6942
- <sup>110</sup> G. K. Seward, Q. Wei, I. J. Dmochowski, *Bioconjugate Chem.* **2008**, 19, 2129
- <sup>111</sup> G. K. Seward, Y. Bai, N. S. Khan, I. J. Dmochowski, *Chem. Sci.*, **2011**
- <sup>112</sup> N. Kotera, L. Delacour, T. Traoré, N. Tassali, P. Berthault, D-A. Buisson, J.-P. Dognon, B. Rousseau, *Org. Lett.*, **2011**, 13, 9
- <sup>113</sup> T. Nanno, M. Deguchi, Patent US2008/306308 A1 **2008**.
- <sup>114</sup> C. Tahtaoui, I. Parrot, P. Klotz, F. Guillier, J.-L. Galzi, M. Hibert, B. Ilien, *J. Med. Chem.* **2004**, 47, 4300.
- <sup>115</sup> M. F. Salomon, R. G. Salomon, *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, 101, 4290.
- <sup>116</sup> D. Xu, R. Warmuth, *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, 130, 7520
- <sup>117</sup> C. Givélet, J. Sun, D. Xu, T. J. Emge, A. Dhokte, R. Warmuth, *Chem. Commun.*, **2011**, 47, 4511
- <sup>118</sup> C. Garcia, J. Malthête, A. Collet, *Bull Soc Chim Fr*, **1993**, 130, 93
- <sup>119</sup> C. Garcia, A. Collet, *Bull Soc Chim Fr*, **1995**, 132, 52
- <sup>120</sup> E. L. Que, C. J. Chang, *Chem. Soc. Rev.*, **2010**, 39, 51
- <sup>121</sup> C. S. Bonnet, E. Tóth, *Future Med. Chem.*, **2010**, 2, 367
- <sup>122</sup> G. Anderegg, *Pure & Appl. Chem.*, **1982**, 54, 2693
- <sup>123</sup> J. Ogier, Thèse de doctorat en chimie organique de l'Université Paris Sud
- <sup>124</sup> K. Hanaoka, K. Kikuchi, Y. Urano, M. Narazaki, T. Yokawa, S. Sakamoto, K. Yamaguchi, T. Nagano, *Chem. Biol.* **2002**, 9, 1027
- <sup>125</sup> J. L. Major, G. Parigi, C. Luchinat, T. J. Meade, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, 104, 13881
- <sup>126</sup> A. C. Esqueda, J. A. Lopez, G. Andreu-de-Riquer, J. C. Alvarado-Monzon, J. Ratnakar, A. J. M. Lubag, A. D. Sherry, L. M. De Leon-Rodriguez, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131, 11387
- <sup>127</sup> J. L. Major, R. M. Boiteau, T. J. Meade, *Inorg. Chem.* **2008**, 47, 10788
- <sup>128</sup> X. A. Zhang, K. S. Lovejoy, A. Jasanoff, S. J. Lippard, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, 104, 10780
- <sup>129</sup> R. Trokowski, J. Ren, F. K. Kálmán, A. D. Sherry, *Angew. Chem.* **2005**, 117, 7080 ; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 6920
- <sup>130</sup> N. Kotera, N. Tassali, E. Léonce, C. Boutin, P. Berthault, T. Brotin, J.-P. Dutasta, L. Delacour, T. Traoré, D.-A. Buisson, F. Taran, S. Coudert, B. Rousseau, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, 17, 4100
- <sup>131</sup> S. Aime, C. Carrera, D. Delli Castelli, S. Geninatti Crich, E. Terreno, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2005**, 44, 1813
- <sup>132</sup> M. Woods, D. E. Woessner, A. D. Sherry, *Chem. Soc. Rev.*, **2006**, 35, 500
- <sup>133</sup> S. Aime, A. Barge, D. Delli Castelli, F. Fedeli, A. Mortillaro, F. U. Nielsen, E. Terreno, *Magn. Reson. Med.*, **2002**, 47, 639
- <sup>134</sup> A. Barge, L. Tei, D. Upadhyaya, F. Fedeli, L. Beltrami, R. Stefanià, S. Aime, G. Cravotto, *Org. Biomol. Chem.*, **2008**, 6, 1176
- <sup>135</sup> D. A. Moore, *Org. Synth.* **2008**, 85, 10

- <sup>136</sup> T. Ke, Y. Feng, J. Guo, D. L. Parker, Z-R. Lu, *Magn. Res. Imaging*, **2006**, 24, 931
- <sup>137</sup> R. Y. Tsien, *Annu. Rev. Biochem.* **1998**, 67, 509
- <sup>138</sup> M. Chalfie, S. R. Kain, Eds., *GFP: Green Fluorescent Protein Strategies and Applications* (Wiley, New York, **1998**)
- <sup>139</sup> S. R. Adams, R. E. Campbell, L. A. Gross, B. R. Martin, G. K. Walkup, Y. Yao, J. Llopis, R. Y. Tsien, *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, 124, 6063
- <sup>140</sup> Y. Ueno, G-S. Jiao, K. Burgess, *Synthesis*. **2004**, 15, 2591
- <sup>141</sup> E. Genin, O. Carion, B. Malher, B. Dubertret, N. Arhel, P. Charneau, E. Doris, C. Mioskowski, *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, 130, 8596
- <sup>142</sup> V. R. Prasad, G. V. Kalpana (eds.), *HIV Protocols: Second Edition*, **2009**, 485, Chapter 11
- <sup>143</sup> F. Ribes, R. Guglielmetti, J. Metzger, *Bull. Soc. Chim. Fr.*, **1972**, 143
- <sup>144</sup> T. G. Walker, W. Happer, *Rev. Mod. Phys.* **1997**, 69, 629
- <sup>145</sup> H. Desvaux, T. Gautier, G. Le Goff, M. Pétro, P. Berthault, *Eur. Phys. J. D* **2000**, 12, 289